

EFFECTOS DEL EXTRACTO HIPOFISIARIO DE CARPA COMÚN Y EL ANÁLOGO DE LA GnRH SOBRE LA MADURACIÓN FINAL DEL OOCITO Y EL DESOVE DE LA CACHAMA NEGRA (*Colossoma macropomum*)

Effects of Hypophysial Extract of Common Carp and the Analog of the GnRH on the final maturation oocyte and the spawning of cachama negra (*Colossoma macropomum*)

Juan José Arias Acuña y Jim Lenrry Hernández Rangel

Laboratorio de Investigaciones Piscícolas, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia.

Teléfono: 0261 7592762; Fax: 0261 7598096. E-mail: jlenrry@yahoo.com

RESUMEN

El objetivo principal de este estudio fue comparar el uso de un análogo de la sGnRH (Ovaprim®) con el extracto de hipófisis de carpa (EHC) en la reproducción inducida de *Colossoma macropomum*. Se evaluaron dos tratamientos, uno con Ovaprim® (0,5 mL/kg) y otro con EHC (5 mg/kg) y un tercer grupo fue el control. El desempeño reproductivo fue evaluado en machos, mediante la producción y concentración de esperma; en las hembras, a través del porcentaje de ovulación, fecundidad absoluta, fecundidad relativa, tasa de fecundación y tasa de eclosión. El Ovaprim® tuvo un efecto similar al EHC en la producción y concentración del semen de los machos inyectados. En las hembras, el porcentaje de ovulación fue similar (100%) en ambos tratamientos. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) en el número de óvulos producidos con Ovaprim® ($155,6 \times 10^3$) y EHC ($67,5 \times 10^3$). Las mejores tasas de fecundación y eclosión se obtuvieron en el grupo tratado con EHC (63,26 y 68,48%) que con Ovaprim® (11,12 y 19,75%, respectivamente). Estos resultados indican que el tratamiento con Ovaprim® es efectivo para inducir el desove, pero produce óvulos de baja calidad.

Palabras clave: Hipófisis de carpa, Ovaprim®, *Colossoma macropomum*, sGnRHa.

ABSTRACT

The primary target of this study was to compare the use of an analog of sGnRH (Ovaprim®) with the carp pituitary extract

(CPE) in the induced reproduction of *Colossoma macropomum*. Three treatments, one control, one with Ovaprim® (0.5 mL/kg) and one with CPE were evaluated (5mg/kg). The reproductive performance was evaluated in males, by means of the production and concentration of sperm, in the females, spawning ratio, absolute fecundity, relative fecundity, rate of fertilization and hatching. The Ovaprim® had an effect similar to the CPE in the production and concentration of semen of the injected males. The spawning ratio was similar (100%) in both treatments. A statistically significant ($P < 0.05$) difference between the number of eggs obtained with Ovaprim® (155.6×10^3) and CPE (67.5×10^3). The best rates of fertilization and hatching were obtained in the group treated with CPE (63.26 and 68.48%) that with Ovaprim® (11.12 and 19.75%), respectively. These results indicate that the treatment with Ovaprim® is effective to induce the spawning, but produces eggs of low quality.

Key words: Carp pituitary, Ovaprim®, *Colossoma macropomum*, sGnRHa.

INTRODUCCIÓN

Los peces en su hábitat natural están sometidos a constantes estímulos ambientales que activan una serie de eventos fisiológicos como son la proliferación oogonial, la vitelogénesis, la maduración de los oocitos y la ovulación, que provocan la formación y desarrollo de los gametos dando inicio a los procesos reproductivos. Los peces en cautiverio no se reproducen de manera espontánea, en estas condiciones, las gónadas de los mismos crecen y se desarrollan normalmente, pero la maduración final del oocito, la ovulación y la espermiación no ocurren [10]. Estos eventos, que en el medio natural son iniciados por un aumento en la secreción

de la gonadotropina hipofisiaria (GtH) [19], son bloqueados en los peces mantenidos en cautividad. Estudios realizados, por varias décadas, en numerosas especies han demostrado que es posible reforzar hormonalmente o reemplazar enlaces específicos en las vías reproductivas a través de la intervención hormonal [30].

Las principales hormonas involucradas en la reproducción de los teleósteos son: la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la GtH y los esteroides gonadales. Estas hormonas, así como otras que no se encuentran en los peces, sino que controlan las actividades reproductoras de los mamíferos, se han usado en diversas ocasiones para inducir la reproducción de teleósteos [4].

Las hormonas luteinizante y foliculo estimulante, son esenciales en la función ovárica de los mamíferos. La secreción de estas hormonas está regulada por el factor liberador de la hormona luteinizante (LHRH), el cual es un decapeptido de origen hipotalámico [9]. Las GnRH de los teleósteos son estructuralmente similares a las LHRH de los elasmobranchios, reptiles y aves, y difieren de los mamíferos y anfibios, sin embargo, la actividad biológica de los factores liberadores de la GtH de todos estos grupos zoológicos es parecida [5]. Es por ello, que en muchas especies de teleósteos, el LHRH o sus análogos estructurales (LHRHa), estimulan la secreción de GtH [27].

La GnRH y la dopamina (DA) son, respectivamente, las principales neurohormonas estimuladora e inhibidora que controlan la liberación de la GtH en los peces [2]. El aumento de la GtH que precede la maduración del oocito y la ovulación, es el resultado de una estimulación por la GnRH en combinación con un decrecimiento de la inhibición de la dopamina [14].

El análogo de la hormona liberadora de GtH de salmón (*Salmo salar*) (sGnRHa) ha sido encontrado como un análogo superactivo en todos los peces donde se ha estudiado [29]. La modificación de aminoácidos en posición 6 de los análogos realiza la potencia porque incrementan la resistencia a la degradación enzimática [40] y la afinidad hacia receptor [15].

La doble regulación neurohormonal de la secreción de GtH a través de la GnRHa y la DA actúa como un factor liberador-inhibidor, el cual proporciona la base para la técnica altamente efectiva para inducir la ovulación de muchos peces de cultivo. Esta consiste en la inyección intraperitoneal o intramuscular de un análogo de la GnRH, específicamente el sGnRHa o el [D-Ala⁶, Pro⁹-NET]-mGnRH (mGnRHa), más un antagonista del receptor de la DA, específicamente pimozide o domperidona, para remover la influencia inhibitoria de la DA para secreción de la GtH en la hipófisis [29]. Esta combinación permite estimular un aumento de GtH en el pez dorado (*Carassius auratus*) [33] y en carpa común (*Cyprinus carpio*) [17]. Este método para inducir la ovulación en los peces de cultivo ha sido denominado como técnica Limpe [28]. La formulación de sGnRHa y domperidona ha sido patentada como kit para desove Ovaprim.

La cachama negra (*Colossoma macropomum*) es una especie dulceacuícola ampliamente distribuida en toda la cuenca amazónica. En la actualidad se le considera como uno de los peces de mayor potencial productivo y reproductivo para la piscicultura extensiva, semi-intensiva e intensiva en aguas continentales de los países que integran la gran cuenca amazónica [26]. El protocolo más ampliamente usado en la reproducción inducida de esta especie, es empleando extracto de hipófisis de carpa [1], aunque actualmente la tendencia es la búsqueda de otros inductores que permitan obtener mejores resultados en cuanto a la calidad de los gametos producidos [39]. El objetivo principal de este estudio fue comparar el uso de un análogo de la sGnRH (Ovaprim®) con la hipófisis de carpa en la maduración final del oocito y el desove de la cachama negra (*C. macropomum*). Los tratamientos se evaluaron de acuerdo al diámetro de los oocitos durante el experimento, ovulación, fecundidad y tasas de fecundación y eclosión obtenidas. En los machos se evaluó la producción total y la concentración del semen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de los reproductores

Los ensayos de inducción fueron realizados en las instalaciones del laboratorio de Investigaciones Piscícolas (LIP) de la Facultad Experimental de Ciencias de La Universidad del Zulia. Los peces reproductores de cachama negra (*C. macropomum*) fueron adquiridos en la Granja Piscícola "El Brillante" localizada en la Pedrera, estado Táchira, Venezuela.

Aclimatación

Los peces fueron mantenidos en lagunas artificiales de concreto del LIP, durante un período de 3 meses, a los animales se le suministró alimento concentrado comercial Arcoiris 40% de proteína y expuestos a un fotoperíodo natural.

Selección de los reproductores

El ensayo se realizó en el mes de Septiembre 2005, antes del experimento se procedió a la verificación del sexo. Se seleccionaron los machos que con una leve presión en el abdomen dejaron salir una gota de semen [37] y las hembras por presentar su papila urogenital enrojecida y la presencia de ovocitos obtenidos con una biopsia ovárica. Finalmente fueron marcados con placas metálicas. Para el ensayo, los peces fueron distribuidos por grupos según el tratamiento correspondiente, así como también se registró su peso y talla. Para cada grupo experimental se utilizaron 3 hembras y 3 machos, excepto en el control (2 hembras y 3 machos).

Durante los tratamientos, se realizaron mediciones de la temperatura, oxígeno disuelto utilizando un medidor YSI modelo 52 CE (EUA), el pH con un pHmetro (Corning 313, Inglaterra) para determinar la calidad fisicoquímica del agua de los tanques durante el desove y de las incubadoras.

Determinación del diámetro y del estadio de madurez de los oocitos

Al comienzo del experimento se tomaron de cada hembra muestras de oocitos empleando el método de biopsia ovárica siguiendo el protocolo descrito por Tamaru y col. [36]. Cada muestra fue dividida en dos porciones, una de ellas fue fijada con formalina tamponada al 10% para medir el diámetro de los oocitos y la otra se sometió al líquido aclarador Serra (etanol 60%, formalina 30% y ácido acético glacial 10%) para determinar la posición del núcleo [30].

La medición del diámetro de los oocitos se realizó utilizando un microscopio óptico Olympus Optical C.O L.t.d. CHT (Japón) provisto de un micrómetro ocular calibrado con un objetivo de 10X. Para determinar el estado de madurez de los oocitos se utilizó la clasificación propuesta por Malison y col. [20]. Las muestras de oocitos fueron extraídas de todas las hembras justo antes de cada aplicación de hormona y en el desove.

Tratamiento hormonal

Se realizaron dos tratamientos hormonales: uno, empleando extracto de hipófisis de carpa común (lío-filizado) y el otro con el análogo de la sGnRH "Ovaprim[®]" (TABLA I). Ovaprim[®] (Syn-del, Vancouver, Canadá), contiene 20 µg de GnRHa de salmón (sGnRHa; D-Arg⁶, Trp⁷, Leu⁸, Pro⁹-NEt) y 10 mg domperidona por mL [35]. Un tercer grupo de peces fue el control. Se utilizaron las dosis hormonales para *C. macropomum* recomendadas por los fabricantes y algunos autores [13, 35, 37].

TABLA I
DOSIS CORRESPONDIENTES A LOS TRATAMIENTOS HORMONALES/ CORRESPONDING DOSES TO THE HORMONAL TREATMENTS

Hormona	Sexo	Dosis total	Nº de iny.	Intervalo de dosis (h)
EHC	H	5 mg/kg	2	12
EHC	M	1,5 mg/kg	1	-
Ovaprim	H	0,5 mL/kg	1	-
Ovaprim	M	0,5 mL/kg	1	-

Para la inyección del EHC fue usado como vehículo una solución isotónica de NaCl 0,9% (0,5 mL/kg). La aplicación de la única dosis (1,5 mg/kg) de los machos coincidió con la dosis final de las hembras. A los peces del grupo control se les aplicó solución isotónica a 0,5 mL/kg. Todas las inyecciones se realizaron intraperitonealmente. Los huevos y el semen fueron colectados a través del "stripping" o extrusión abdominal.

Evaluación de los machos

Luego del "stripping", el volumen de esperma fue medido individualmente a cada macho usando tubos de ensayo graduados. La concentración del semen fue determinada según lo descrito por Cieresko y Dabrowsky [6]. La producción total de esper-

ma fue calculada con base a la producción de semen por pez (mL/kg) y la concentración de semen se evaluó en relación al número de espermatozoides producidos (cel/mL y cel/kg).

La determinación del espermatocrito se realizó según el método propuesto por Cieresko y Dabrowsky [6]. Usando tubos capilares de 75-mm (Haematokrit-Kapillaren, Alemania Occidental), y sellando uno de sus extremos se agitó a 11000 rpm por 15 min. en una centrifuga Autocrit Ultra3 modelo 0575 (EUA).

Evaluación de las hembras

El porcentaje de ovulación fue calculado para cada grupo experimental según lo descrito por Kestemont [16], relacionando el número de hembras que ovularon entre el número de hembras inyectadas. Luego de ser comprobada la ovulación se procedió a la realización del "stripping" a cada hembra, realizando la extracción de huevos de la misma forma en todos los peces. Los óvulos obtenidos de cada hembra fueron colectados en vasos de precipitado (300 mL), después se pesaron el total de óvulos extraídos en una balanza marca Mettler modelo PJ300 (Suiza). Luego se efectuó el conteo de los mismos a una muestra de 1 g, con ayuda de una lupa estereoscópica Will modelo KG 6631 (Alemania) y este valor fue extrapolado para estimar el número total de la muestra. La fecundidad absoluta fue estimada de acuerdo al total de óvulos producidos (g óvulos/pez) y la fecundidad relativa se calculó con base al número de óvulos por el peso de cada hembra (g óvulos/kg y nº de óvulos/kg).

La fecundación se realizó según lo recomendado por Galvão [12] tomando muestras de 150-200 g de óvulos, las cuales fueron empleadas para la fecundación en seco (adicionando el esperma sobre los óvulos y mezclándolos durante varios minutos), posteriormente se llevaron a cada incubadora cónica (acrílica) de 20 L de capacidad con aireación y flujo ascendente de agua.

La tasa de fecundación fue calculada en función al número óvulos fecundados y el número total de óvulos [11]. La tasa de eclosión (%) fue calculada relacionando el número de larvas viables de muestras con el total de óvulos no eclosionados [25].

Análisis estadístico

Las medidas de los diámetros fueron analizados desde el punto de vista descriptivo (promedio, desviación estándar, valor mínimo y valor máximo). Adicionalmente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) [34] de dos vías para verificar posibles diferencias significativas entre los diámetros ($P < 0,05$). Se realizó un ANOVA de una vía para establecer si existían diferencias significativas entre los parámetros a evaluar en los diferentes tratamientos. Los datos fueron tabulados en el programa Microsoft Excel 2003 y procesados en el programa STATGRAPHICS Plus para Windows Versión 4,1 [34].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El peso y la longitud promedio de los peces correspondió a 6450 ± 549 g y $63 \pm 5,5$ cm para las hembras, 4550 ± 589 g y $59 \pm 3,8$ cm para los machos. Los parámetros físico-químicos del agua de los tanques fueron de $29 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura, pH de 7 ± 1 y oxígeno disuelto de 6 ± 2 mg/L.

Evaluación de la espermiación

La respuesta a la espermiación de machos de *C. macropomum* al ser inyectados con una dosis única de extracto de hipófisis de carpa (5 mg/kg) y de Ovaprim® (0,5/mL), fue de 100% (3/3) para los peces de ambos tratamientos. Debido a que la evaluación de los machos se realizó justo en el momento en que las hembras comenzaron a ovular, el intervalo de respuesta fue diferente: Ovaprim (12h), hipófisis (6h). Aunque el intervalo de repuesta ocurrió en tiempos diferentes, se presentó una respuesta positiva en ambos tratamientos, con la expulsión de un flujo copioso de semen al realizar el masaje abdominal en todos los machos excepto en los controles.

Con respecto a la producción del volumen de semen, se apreció que al aplicarles a los peces Ovaprim y la hipófisis de carpa se obtuvieron volúmenes iguales en ambos tratamientos (TABLA II).

Para la concentración espermática del semen producido, y en relación al porcentaje de espermatocrito y en el número de espermatozoides (cel/mL), se encontró que los valores encontrados fueron similares en ambos tratamientos (TABLA II). Analizando los datos se determinó que en los valores de pro-

ducción y concentración de semen no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los tratamientos hormonales.

Según Viveiros y col. [38], cuando los machos del bagre Africano (*Clarias gariepinus*) fueron tratados con hipófisis de carpa y de la especie, Ovaprim y el análogo de la mGnRH ([D-Ala⁶]-GnRHa), todas las hormonas empleadas elevaron los niveles de LH de la sangre pero la mayor hidratación testicular fue observada en los peces tratados con extractos hipofisarios. Cuando la espermiación fue inducida en Tenca común (*Tinca tinca* L.), la inyección del análogo de la sGnRH [D-Arg⁶, Pro⁹-Net] a 20g/kg de PC., incrementó el número relativo de espermatozoides (cel/kg de PC) al compararlo con hipófisis de carpa [18].

Luego de un tratamiento hormonal, en los machos se produce un descenso en la concentración espermática debido a la producción de líquido espermático y a la hidratación testicular, lo que reducen la densidad de los espermatozoides [22]. Este trabajo establece que el Ovaprim y el EHC producen un efecto similar, en la espermiación de los machos de *C. macropomum*, debido a que inducen igual hidratación testicular en el semen de los peces tratados.

Madurez de los oocitos

La biopsia ovárica mostró que, el estado inicial de madurez de los oocitos de las hembras de los tratamientos (TABLA III), más del 50% se encontraban con la vesícula germinal migrando, 57,67% para el grupo del EHC y 59,33 % para el grupo de Ovaprim y 60% para el grupo control, sin encontrarse diferencias significativas entre estos valores ($P > 0,05$). La evaluación de los estadios de madurez indica que la mayoría de

TABLA II

PROMEDIOS DE LOS PARÁMETROS DEL SEMEN EN MACHOS DE *Colossoma macropomum* TRATADOS CON HIPÓFISIS DE CARPA (EHC) Y OVAPRIM/ AVERAGES OF THE SEMINAL PARAMETERS OF SEMEN IN MALES OF *Colossoma macropomum* INJECTED WITH CARP PITUITARY AND OVAPRIM.

Hormona	Vol. mL.	mL/kg PC	Espermatocrito (%)	Cel/mL ($\times 10^9$)	Cel/kg ($\times 10^9$)
EHC	$6,3 \pm 3,01^a$	$1,20 \pm 0,049^a$	$22,4 \pm 5^a$	$6,73 \pm 3,0^a$	$8,99 \pm 7,27^a$
Ovaprim	$6,8 \pm 2,69^a$	$1,51 \pm 0,54^a$	$19,5 \pm 1,3^a$	$4,02 \pm 0,29^a$	$6,12 \pm 2,51^a$

^a Las medias con el mismo supraíndice no son diferentemente significativas ($P > 0,05$).

TABLA III

MADUREZ INICIAL DE LOS OOCITOS DE LAS HEMBRAS DE CACHAMA (*Colossoma macropomum*) (N = HEMBRAS TRATADAS). LOS VALORES ESTÁN EXPRESADOS COMO PROMEDIO (\pm DESVIACIÓN ESTÁNDAR)/ INITIAL MATURITY OF THE OOCYTES OF THE FEMALES OF CACHAMA (*Colossoma macropomum*) (N = TREATED FEMALES). THE VALUES ARE EXPRESSED LIKE AVERAGE (\pm STANDARD DEVIATION).

Tratamiento	n	Posición de la vesícula germinal		
		Céntricos (%)	Migrando (%)	Periférica (%)
Hipófisis	3	$42,33 \pm 4,04^a$	$57,67 \pm 4,04^a$	0
Ovaprim	3	$40,67 \pm 1,15^a$	$59,33 \pm 1,15^a$	0
Control	2	$40 \pm 1,0^a$	$60 \pm 1,0^a$	0

^a Las medias con el mismo supraíndice no son diferentemente significativas ($P > 0,05$).

los oocitos de las hembras se encontraban con vesícula germinal migrando, evidencia clara que habían completado la vitelogenénesis e iniciado la maduración final, condición adecuada para la inducción hormonal [21, 39].

Evaluación de los diámetros de los oocitos

En el momento antes de suministrar cada dosis y al de-sovar, se tomaron muestras de oocitos para ver la evolución de madurez así como también el incremento del diámetro. En el grupo de peces tratados con hipófisis de carpa hubo un notable incremento en el diámetro promedio de los oocitos. En el grupo de peces tratados con Ovaprim no hubo cambios en los diámetros entre las horas 0 y 12 (TABLA IV).

Debido a que la administración de EHC requiere 2 inyecciones de la solución, se tienen mediciones de los oocitos en tres tiempos mientras para la administración de Ovaprim solo se realizaron mediciones de 2 tiempos (inicial y final). Para poder comparar los efectos, se tomaron solo los tiempos iniciales y finales de cada tratamiento.

El incremento de diámetro observado después de administrar las dosis hormonales, se debió a la expansión experimentada por los oocitos como consecuencia de la acumulación de vitelo y agua, pues se ha demostrado que en los peces la maduración final está asociada a un proceso de hidratación [5, 32]. Como puede notarse en la TABLA V, este incremento fue mayor en los peces tratados con hipófisis de carpa, los tratados con Ovaprim no sufrieron variaciones en todo el experimento.

A pesar de que en los peces tratados con hipófisis de carpa presentaron un ligero incremento, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($P>0,05$). Estos datos indican que la administración de hipófisis de carpa presentó un igual efecto que el Ovaprim, desde el punto de vista estadístico, en la variación del diámetro de los oocitos.

Ovulación

En el tratamiento con hipófisis de carpa la ovulación se registró a las 6h luego de ser administrada la dosis definitiva, en las hembras inyectadas con Ovaprim la ovulación ocurrió a

TABLA IV
ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE LOS OOCITOS EN LA INDUCCIÓN A LA OVULACIÓN DE *Colossoma macropomum* TRATADAS CON EXTRACTO DE HIPÓFISIS DE CARPA Y OVAPRIM/ DESCRIPTIVE STATISTIC OF THE OOCYTES IN THE INDUCTION TO THE OVULATION OF *Colossoma macropomum* INJECTED WITH CARP PITUITARY AND OVAPRIM.

Tratamiento	Tiempo (h)	n	Diámetro de los oocitos (mm)		
			X ± S	Min.	Máx.
Control	0	2	0,91 ± 0,09	0,57	1,13
Control	12	2	0,93 ± 0,09	0,77	1,3
Control	24	2	0,91 ± 0,09	0,77	1,13
EHC	0	3	0,92 ± 0,08	0,67	1,17
EHC	12	3	0,93 ± 0,09	0,67	1,23
EHC	24	3	0,98 ± 0,07	0,83	1,2
Ovaprim	0	3	0,93 ± 0,07	0,67	1,1
Ovaprim	12	3	0,93 ± 0,06	0,73	1,2

TABLA V
CAMBIOS EN EL DIÁMETRO DE LOS OOCITOS DE LAS HEMBRAS *Colossoma macropomum*/ CHANGES IN THE DIAMETER OF THE OOCYTES OF FEMALES *Colossoma macropomum*.

Tratamiento	Hembra N° placa	Diámetros (mm)*		Incremento de diámetro	
		Inicial	Final	(mm)	(%)
Control	64	0,94	0,92	-0,02	-2,3
Control	8	0,88	0,90	0,02	2,4
Hipófisis	63	0,95	1,01	0,06	5,5
Hipófisis	s/p	0,91	0,95	0,04	4,2
Hipófisis	46	0,88	0,98	0,10	10,2
Ovaprim	48	0,91	0,92	0,01	1,1
Ovaprim	50	0,93	0,93	0,00	0,0
Ovaprim	51	0,93	0,94	0,01	1,1

*Valores promedio del diámetro de los oocitos (n = 100).

las 12 h, luego de la inyección de una única dosis. Con respecto a la inducción de las hembras, se obtuvo un 100% de respuesta en ambos tratamientos. En el grupo de peces control no hubo desove.

Debido que los mecanismos de acción, para maduración de los peces, de los tratamientos empleados son diferentes, por esto se obtienen intervalos de respuesta en tiempos diferentes (6 h para EHC y 12 h para Ovaprim). Esto concuerda con lo reportado por Da Silva y col. [8] para hembras de *C. macropomum* que empleando hipófisis de carpa el desove se produce a las 9-10h (29°C ± 1°), mientras que para la LHRHa se da a partir de 12h (29°C ± 1°).

Fecundidad

Durante el “stripping”, los huevos fueron expulsados en forma de un flujo copioso y presentaron un color verde claro. Solo a la hembra número 50, no fue posible realizarle la extracción de los óvulos debido que presentó un plug o un tapón en la abertura genital que impidió la salida de los huevos [31].

El peso promedio de los óvulos de las hembras tratadas con Ovaprim fue de 714,75 g. mientras que con hipófisis de carpa fue de 339,24 g. (TABLA VI), encontrándose diferencias significativas entre estos pesos (P<0,05).

Según estos valores, el peso promedio de los óvulos producidos en el tratamiento con Ovaprim representa aproximadamente 12% del peso de las hembras, mientras que para el tratamiento con hipófisis de carpa el peso de los óvulos es el 5% del peso de las hembras. Según Brzuska [3], en los ensayos realizados en distintas especies de peces se ha encontrado que el peso de los óvulos obtenidos es mayor cuando se aplican hormonas sintéticas que cuando se usan hormonas de origen natural, tales como EHC, GCH, etc.

El promedio del número total de óvulos (óvulos/kg) producidos fue superior en las hembras las cuales fueron inyectadas con Ovaprim 155,5x10³ al compararlas con el número de huevos de las hembras inducidas con hipófisis de carpa 67,5x10³, encontrándose diferencias significativas entre estos valores (P<0,05). Useche [37], señala que el número promedio de huevos desovados por hembras de *C. macropomum* es de 100x10³ óvulos/kg. Los resultados obtenidos indican que el Ovaprim tiene un mayor efecto en la producción de óvulos al compararlo con la hipófisis de carpa.

Fecundación y eclosión

Los parámetros fisicoquímicos del agua de las incubadoras fueron de 30 ± 1°C de temperatura, pH de 7 ± 1, oxígeno disuelto de 5 ± 2 mg/L. Los huevos fecundados presentaron aspectos transparentes, una división celular nítida y simétrica, mientras que los huevos no viables presentaron color blancuzco u opaco. En cuanto a la tasa de fecundación (TABLA VII), los mayores resultados se obtuvieron en hembras tratadas con EHC (63,26%) que con Ovaprim (11,12%), encontrándose diferencias significativas entre estos valores (P<0,05).

TABLA VI
COMPARACIÓN DE LA FECUNDIDAD ABSOLUTA Y RELATIVA DE LAS HEMBRAS DE *Colossoma macropomum* QUE DESOVARON DURANTE EL ENSAYO/
COMPARISON OF THE ABSOLUTE AND RELATIVE FECUNDITY OF THE FEMALES OF *Colossoma macropomum* THAT SPAWNING DURING THE EXPERIMENT.

Tratamiento	n	Óvulos (g.)	gr óvulos/kg **	Óvulos/kg (x10 ³)*
Hipófisis	3	339,24 ± 99,5 ^a	52,2 ± 16,41 ^a	67,5 ± 21,2 ^a
Ovaprim	2	714,74 ± 6,7 ^b	120,2 ± 5,1 ^b	155,6 ± 5,1 ^b

*1g de óvulos ± 1294.5 óvulos. **Gr. de óvulos por kg de peso corporal. ^a Las medias con el mismo subíndice no son diferentemente significativas (P>0,05).

TABLA VII
PROMEDIOS DE LOS VALORES DE FECUNDACIÓN (%) Y ECLOSIÓN (%) OBTENIDOS DE *Colossoma macropomum* TRATADOS CON HIPÓFISIS DE CARPA (EHC) Y OVAPRIM/
AVERAGES OF THE VALUES OF FERTILIZATION (%) AND HATCHING (%) OBTAINED OF *Colossoma macropomum* INJECTED WITH CARP PITUITARY (CPE) AND OVAPRIM.

Tratamiento	Fecundación (%)	Eclosión (%)
EHC	63,2 ± 11,2 ^a	68,4 ± 9,0 ^a
OVAPRIM	11,1 ± 5,3 ^b	19,7 ± 12,8 ^b

^a Las medias con el mismo subíndice no son diferentemente significativas (P>0,05).

Para la tasa de eclosión también se obtienen mayores porcentajes en los peces donde se administró la hipófisis de carpa (68,48%) que en el Ovaprim (19,75%). Según estos resultados, para los tratamientos empleados se evidencia una baja calidad de los óvulos obtenidos con el Ovaprim al presentarse valores bajos de fecundación y eclosión (TABLA VII).

Los valores obtenidos en la fecundación y eclosión de los óvulos en este ensayo fueron bajos, lo cual pudo haber ocurrido por el método empleado. Perdomo y col. [26] indican que se obtienen mejores tasas de fecundación y eclosión cuando los peces desovan naturalmente que por extrusión, debido posiblemente a la fricción que se le hace a los óvulos al momento de ser extraídos, lo cual puede provocar el rompimiento de estos.

Según los datos obtenidos en este experimento en el tratamiento con el Ovaprim se obtiene una mayor producción de óvulos (óvulos/kg) que la hipófisis de carpa, pero se observan mejores tasas de fecundación y eclosión con la hipófisis de carpa. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Da Silva [8], al analizar los parámetros de eficiencia de los tratamientos hormonales para *C. macropomum*, y encontraron que empleando un análogo de la LHRH la ovulación y la producción de óvulos se obtienen mejores índices 91,2% y 123g óvulos/kg que con hipófisis de carpa 77,7% y 77g óvulos/kg, respectivamente. En tasa de fecundación se obtuvo mejor re-

sultado en el tratamiento de hipófisis de carpa (64,3%) que con el tratamiento con LHRHa (52,4%).

Se ha reportado en muchos casos que el uso de análogos sintéticos son altamente efectivos para inducir el desove de muchas especies de peces, pero también se han observado efectos indeseados, tanto para la fecundación como para la viabilidad de los embriones y las larvas.

Resultados similares fueron reportados [13], en *C. macropomum* al ser inyectadas intraperitonealmente con 5 mg/kg de hipófisis de cachama, sólo o en combinación de un análogo de la LHRH ([Des Gli¹⁰ D-Ala⁶] LHRH etilamida) a 50 µg/kg, administrada 12 horas después de la administración de la hipófisis. Para el tratamiento con hipófisis más el análogo se obtuvo un porcentaje de ovulación del 60% en comparación con 40% de los peces inyectados con hipófisis sola. Sin embargo, la viabilidad de los huevos fue baja 20% cuando se usó el análogo que con hipófisis sola 40%.

Cordero y col. [7] reportaron que, para la inducción del bocachico (*Prochilodus magdalenae*), el Ovaprim indujo la maduración final y ovulación con bajo índice de ovulación (33,3-41,6%) al compararlo con la respuesta de las hembras inducidas con EHC (91,6%). También señalan que, con el uso de hipófisis de carpa (6mg/kg) se obtienen mejores tasas de fecundación (89,2%) al compararlo con el Ovaprim (47,1%), pero utilizando dosis de 0,7 mL/kg de este análogo se pueden obtener tasas de fecundación de 81,9%.

Aunque las concentraciones de espermatozoides de ambos tratamientos no presentaron diferencias, pudo ocurrir que existieran diferencias en la motilidad del esperma lo cual afecta los valores de fecundación.

En este experimento, los diámetros pre-inducción y post-inducción de los oocitos no presentaron diferencia significativa ($P>0,05$) en los peces inyectados, tanto con Ovaprim como con extracto hipofisiario de carpa. Resultados similares se reportan [7] para la inducción del bocachico (*Prochilodus magdalenae*), donde el uso del Ovaprim y EHC no tuvieron efecto sobre el diámetro de los oocitos.

Cuando se evaluó el uso del Ovaprim en la inducción del bagre (*Sorubim cuspicaudus*), el desempeño reproductivo fue similar al de los peces que fueron tratados con hipófisis de carpa (8mg/kg), incluso cuando se administraron dosis más bajas (0,25 mL/kg) de las recomendadas [24].

El Ovaprim es una combinación de análogo de salmón (sGnRHa) y domperidona en concentraciones de 20 µg/mL y 10 mg/mL, respectivamente [35]. Para su uso, la casa fabricante recomienda la aplicación de dosis de 0,5 mL/kg de peso; es probable que la cantidad de hormona aplicada fue muy alta y dado el estado de madurez que presentaban los peces, es posible que el efecto haya sido producir un exceso de GtH y como consecuencia no hubo buena maduración y por tanto se afectó la calidad de los óvulos.

Tal como lo señala Mojica [23], la combinación de LHRHa2 con domperidona resultó ser altamente eficiente en el desove de *Prochilodus scrofa* pero solo a dosis bajas se pudo obtener mejores tasas de fecundación y eclosión.

En los peces donde se administró hipófisis, aunque se presentó una menor producción de óvulos que el Ovaprim, se obtuvo una mejor calidad de éstos. La acción del Ovaprim fue tan efectiva que permitió la incorporación de un mayor número de oocitos para el proceso de maduración, aunque se vio afectado el desarrollo final de los oocitos.

CONCLUSIONES

La aplicación del Ovaprim tuvo un efecto similar que la hipófisis de carpa en los machos de *Colossoma macropomum* con respecto a la concentración y producción total de esperma.

El incremento de diámetro de los oocitos fue mayor en el tratamiento con hipófisis de carpa en comparación con el Ovaprim, aunque no presentaron diferencias significativas.

El número de óvulos producidos por las hembras de *C. macropomum* fue mayor cuando se les administró Ovaprim, en comparación con la hipófisis de carpa.

La aplicación del Ovaprim en la inducción de *C. macropomum* afectó la calidad de los óvulos y probablemente la motilidad de los espermatozoides, reflejándose en bajas tasas de fertilización y eclosión.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ATENCIO, V. G. Producción de alevinos de especies nativas. Departamento de Acuicultura, Centro de Investigación Piscícola (CINPIC). **Rev. MVZ-Córdoba**. 6: (1) 9-14. 2001.
- [2] BLÁZQUEZ, M.; BOSMA, P.T.; FRASER, E. J.; VAN LOOK, K. J. W.; TRUDEAU, V. L. Fish as models for the neuroendocrine regulation of reproduction and growth. **Comp. Biochem. and Physiol.** Part. C. 119:345-364. 1998.
- [3] BRZUSKA, E. Artificial propagation of African catfish (*Clarias gariepinus*): differences between reproduction effects after stimulation of ovulation with carp pituitary homogenate or GnRH-a and dopaminergic inhibitor. **Czech J. Anim. Sci.** 48 (5): 181-190. 2003.
- [4] CAROLSFELD, J. Reproductive physiology and induced breeding of fish as related to culture of *Colossoma*. En: Hernández, A. (Ed). **Cultivo de Colossoma**, 1^{era} Ed. Editorial Guadalupe, Bogotá, Colombia. 37-64 pp. 1989.
- [5] CARRILLO, A. M.; RODRÍGUEZ, J. A. Bases fisiológicas de la reproducción de peces tropicales, VII: 189-217. En: Rodríguez, H., Victoria, P. E., Carrillo, M. (Eds), **Funda-**

- mentos de Acuicultura Continental**, Serie Fundamentos No. 1, 2^{da} Ed. INPA, Bogotá, Colombia, 423 pp. 2001.
- [6] CIERESZKO, A.; DABROWSKY, K. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. **Aquacul.** 109: 367-373. 1993.
- [7] CORDERO, A.; PERTUZ, V.; SOLANO, J. Reproducción inducida del Bocachico (*Prochilodus magdalenae* Steindachner, 1878) con Ovaprim. Departamento de Acuicultura, Centro de Investigación Piscícola (CINPIC). **Rev. MVZ-Córdoba.** 8 (2): 333-335. 2003.
- [8] DA SILVA, M.C.; PINHEIRO, J.L. Cultivo de *Colossoma*. CODEVASF. En: Hernández, A. (Ed) **Cultivo de Colossoma**, 1^{era} Ed. Editorial Guadalupe, Bogotá, Colombia, 260-275 pp. 1989.
- [9] DE LEEUW, R.; GOOS, H. J.; VAN OORDT, P.G. The regulation of gonadotropin release by neurohormones and gonadal steroids in the African catfish, *Clanarias gariepinus*. **Aquacul.** 63: 43-58. 1987.
- [10] DONALDSON, E.M.; HUNTER, G. Induced final maturation, ovulation and spermiation in cultured fish. En: Hoar, W. S., Randall, D. J., Donaldson, E.M. (Ed), **Fish Physiol.** Academic Press, N. Y. 351-403 pp. 1983.
- [11] FERRAZ, E.M.; CERQUEIRA, V.R.; ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; CANDIDO, S. Indução da desova do robalo-peva, *Centropomus parallelus*, através de injeção e implante de LHRHa. **Bol. do Instit. de Pesca.** 28 (2): 125-133. 2002.
- [12] GALVÃO, I. Módulo de propagação artificial de "tambaqui" (*Colossoma macropomum*) e "pacu" (*C. mitrei*). En: Juárez-Palacios J. R. (Ed). **Avances en el cultivo de peces del género Colossoma.** 1989. Proyecto GCP/RLA/102/ITA. FAO. Organización de las Naciones Unidas. Brasil. En línea. <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB491S/AB491S00.htm>. 4/3/07.
- [13] GONZÁLEZ, J.; GUERRERO, H.; CASERES, G.; MARCANO, D. Reproducción inducida de cachama, *Colossoma macropomum* con extracto hipofisiario y un análogo de la hormona liberadora de gonadotropina (LHRH-A). **Acta Científ. Venez.** 42: 229-231. 1991.
- [14] GOOS, H.J.; JOY, K.P.; DE LEUW, R.; GIELEN, J. The effect of luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LHRHa) in combination with different drug with anti-dopamine and anti-serotonin properties on gonadotropin release and ovulation in the African catfish, *Clanarias gariepinus*. **Aquacul.** 63 (1): 143-156. 1987.
- [15] HABIBI, H.R.; PETER, R. E. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors in teleosts. In: Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E., Rolfe, M.S. (Eds), **Proceedings of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish.** Sheffield, England. 7-12 July. 109-113 pp. 1991.
- [16] KESTEMONT, P. Effects of hormonal treatments on induced ovulation in Gudgeon, *Gobio gobio*. **Aquacul.** 68: 373-385. 1988.
- [17] LIN, H. R.; LIANG, J. Y.; VAN DER KRAAK, G.; PETER, R.E. Stimulation of gonadotropin secretion and ovulation in carp common by an analogue of salmon GnRH and domperidone. In: Ohnishi, E., Nagahamaand, Y., Ishizaki, H. (Eds), **Proceedings of the First Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology.** Nagoya University Corporation, Japan. 2-7 March. 155-156 pp. 1987.
- [18] LINHART, O.; PETER, R.E.; ROTHBARD, S.; ZOHAR, Y. Spermiation of common tench (*Tinca tinca* L.) stimulated with injection or implantation of GnRH analogues and injection of carp pituitary extract. **Aquacul.** 129: 119-121. 1995.
- [19] LUTZ, I. Induced spawning-Principles and examples. **Aquacul. Magaz.** 24 (6): 72-76. 1998.
- [20] MALISON, J.; PROCARIONE, L.; KAYES, T. Induction of out-of-season spawning in walleye (*Stizostedion vitreum*). **Aquacul.** 163: 151-161. 1988.
- [21] MARTINO, G. C. Contribución al diagnóstico del desarrollo gonadal para la inducción de Cachama (*Colossoma macropomum*). 2003. **II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura.** 217-222 pp. Revista científica de la Sociedad Española de Acuicultura. En línea <http://www.revistaaquatic.com>. 11/3/07.
- [22] MYLONAS, C.C.; GISSIS, A.; MAGNUS, Y.; ZOHAR, Y. Hormonal changes in male white bass (*Moroe chysops*) and evaluation of milt quality after treatment with a sustained-release GnRH delivery system. **Aquacul.** 153: 301-313. 1997.
- [23] MOJICA, B. Efecto de LHRHa2 combinada con Domperidona (método Linpe) y de la Hipófisis de Carpa (HC), en la maduración final y ovulación de curimbatá *Prochilodus scrofa* (Stendachner, 1881) (Pisces: Characidae). Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura –INPA. Villavicencio. **IV Seminario internacional de acuicultura.** Bogotá, Septiembre 8 al 12. 111-126 pp. 2003.
- [24] MUÑOZ, R.; ATENCIO, V. Evaluación de la reproducción inducida del blanquillo (*Sorubim cuspicaudus*) con Ovaprim. Departamento de Acuicultura. Centro de Investigación Piscícola (CINPIC). **Rev. MVZ-Córdoba.** 8(2): 333-334. 2003.
- [25] PARDO-CARRASCO, S.C.; SUAREZ-MAHECHA, H.; MUÑOZ-LARA, D.; ARIAS-CASTELLANOS, J. A.; GIL, G. Inducción de la ovulación y del desove del yamú, *Brycon siebenthalae*, con implantes de mGnRH-a. **Bol. do Instit. de Pesca.** 28(1): 19-24. 2002.

- [26] PERDOMO, D.; USECHE, M. G.; GONZÁLEZ, M. E. Utilización de macroincubadoras en el proceso de reproducción inducida de cachamas (*Colossoma macropomum*) Pisces Characidae. **Rev. Científ. FCV-LUZ** XII (2): 425-427. 2002.
- [27] PETER, R.E. Structure activity studies on gonadotropin releasing hormone in teleosts, amphibians, reptile and mammals. En: C.L. Ralph (Ed). **Comp. Endocrinology: Developments and Directions**. N.Y. 75-93 pp. 1986.
- [28] PETER, R.E.; LIN, H.R.; VAN DER KRAAK, G. Induced ovulation and spawning of cultured freshwater fish in China: advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonist. **Aquacul.** 74: 1-10. 1988.
- [29] PETER, R.E.; TRUDEAU, V.L.; SLOLEY, B.D. Brain regulation of reproduction in teleosts. **Bull. Inst. Zool.** 16: 89-118. 1991.
- [30] ROTTMANN, R.W.; SHIREMAN, J.V.; CHAPMAN, F.A. Determining Sexual Maturity of Broodstock for Induced Spawning of Fish. Southern Regional Aquaculture Center SRAC. Institute of food and Agricultural Services. Publications SRAC, Florida, USA, No. 423. 1-9 pp. 1991.
- [31] SHEHADEH, Z. H.; ELLIS, J. N. Induced spawning of the striped Mullet (*Mugil cephalus* L). **J. Fish Biol.** 2: 355-360. 1970.
- [32] SINHA, V. R. Hidration of female spawners of carps during hypophysation. **Hydrobiol.** 72 (1): 193-196. 1980.
- [33] SOKOLOWSKA, M.; PETER, R.E.; NAHORNIK, C.S. The effects of different doses of pimozide and [D-Ala⁶, Pro⁹-N ethylamide]-LHRH (LHRH-A) on gonadotropin release and ovulation in female goldfish. **Can. J. Zool.** 63: 1252-1256. 1985.
- [34] STATISTICAL GRAPHICS CORP. Statgrafics. Analytical Software Plus for Windows 4,1. 1999.
- [35] SYNDEL LABORATORIES. How to use ovaprim[®] in fish reproduction and selected ovaprim[®] field results. 2004. Syndel Laboratories. Vancouver, Canada. On Line: <http://www.syndel.com>. 15/3/07.
- [36] TAMARU, C.S.; LEE, C.S.; KELLEY, C.D.; BANNO, J.E.; AIDA, K.; HANYU, L. Characterizing the stage of maturity most receptive to an acute LHRH-a therapy for inducing milkfish *Chanos chanos* to spawn. **Aquacul.** 74: 147-163. 1988.
- [37] USECHE, M. El Cultivo de cachama, manejo y producción. 2004. Universidad Nacional Experimental del Táchira UNET. Táchira, Venezuela. En línea: <http://www.unet.edu.ve/~frey/varios/decinv/piscicultura/cachama/>. 5/2/07.
- [38] VIVEIROS, A. T.; FESSEHAYE, Y.; TER VELD, M.; SCHULZ, R.W.; KOMEN, J. Hand-stripping of semen and semen quality after maturational hormone treatments, in African catfish *Clarias gariepinus*. **Aquacul.** 213: 373-386. 2002.
- [39] VOTO B., J. Piscicultura amazónica con especies nativas. 2004. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), Perú, Lima. En línea: www.fao.org/ag/aGL/agll/rla128/iiap/iiap1/texto.htm. 14/3/07.
- [40] ZOHAR, Y.; GOREN, A.; FRIDKIN, M.; ELHANATI, E. Degradation of gonadotropin-releasing hormones in the gilthead seabream, *Sparus aurata*. II. Cleavage of native salmon GnRH, mammalian LHRH, and their analogs in the pituitary, kidney and liver. **Gen. Comp. Endocrinol.** 79: 306-319. 1990.