

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de  
**DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**Optimización de la reproducción de morenas (*Gymnotus* sp.) en condiciones de laboratorio mediante la utilización de diferentes protocolos de inducción hormonal.**

AUTOR: Lic. LÓPEZ, Pablo Andrés

DIRECTOR: Dr. Méd. Vet. VIGLIANO, Fabricio Andrés

CODIRECTOR: Dr. Méd. Vet. MURGAS, Luis David Solís

LUGAR DE TRABAJO: Cátedra de Piscicultura, Centro de Investigaciones en Piscicultura Experimental, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario.

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. Pablo Adolfo Cerutti  
Dr. David Roque Hernández  
Dr. Pablo Guillermo Rimoldi

I

Dedico esta tesis a mi familia,  
por acompañarme también en este proceso y  
mantener la unión que forjamos desde un inicio.

## **Agradecimientos**

---

A mis padres, todo.

A mi director Dr. Fabricio Andrés Vigliano. Con su guía y aportes, fuimos decidiendo los caminos para llegar a los resultados presentados y alcanzar los objetivos propuestos antes y en el transcurso de esta tesis.

A mi co-director Dr. Luis David Solís Murgas, por sus aportes en mi formación y brindarse de brazos abiertos durante mis estancias en Lavras (Brasil) y, por su intermedio, a Renata.

Al Centro de Investigaciones en Piscicultura Experimental (CIPEX) y la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNR) por los recursos utilizados en el desarrollo de este trabajo.

A las autoridades del Instituto de Ictiología del Nordeste (INICNE) que permitieron el uso de sus instalaciones para este trabajo.

A mis amigos Guillermo y Sebastián, facilitadores y partícipes del trabajo, que se mojaron conmigo.

A mis compañeros y amigos de trabajo en la Facultad, especialmente a los guardianes del CIPEX que cuidan de los peces todo el año, a Belén por su trabajo con los preparados histológicos y al MV Ariel Ugalde, uno de los mentores del CIPEX ya retirado.

A los colegas del INICNE, que me acompañaron y ayudaron en el proyecto haciéndome sentir un integrante del equipo durante mis estancias.

A Viviane, Mônica, Estefânia y Galileu por su compañerismo y, también al grupo de pasantes del Laboratorio de Fisiología (DMV, Universidad Federal de Lavras), por la colaboración durante mis pasantías.

A los Méd.Vet. Laura Coca, José Antonio Casuso y Martín Maciel por facilitarme los ecógrafos y la colaboración en la operación de sexado de ejemplares reproductores.

A Alejandra Cuatrín, sus aportes estadísticos.

A mis hijos, Rodrigo, Facundo y Lola, las moreneadas compartidas.

**Citas bibliográficas correspondientes a las publicaciones parciales del trabajo de Tesis y/o a la difusión realizada en el marco de reuniones científicas**

---

Sánchez, S.; López, P.A.; González, A.O.; Roux, J.P.; Ortiz, J.C.; Fontana, D.A.; Balestieri, D.G.; Hernández, D.R. y Santinón, J.J. (2010).

Desarrollo de tecnologías en piscicultura junto con extractores de carnadas vivas de la provincia de Corrientes.

IV Congreso Nacional de Extensión Universitaria (Mendoza, Argentina).

Barrios, C.E.; López, P.A.; Hernández, D.R.; Roux, J.P.; Santinón, J.J.; Ortiz, J.C.; Domitrovic, H.A.; González, A.O. y Sánchez, S. (2011).

Evaluación del cultivo de morena (*Gymnotus sp.*) en sistemas intensivo y semiintensivo.

III Conferencia Latinoamericana sobre Cultivo de Peixes Nativos y III Congresso Brasileiro de Produção de Peixes Nativos (Lavras, MG, Brasil).

López, P.A., Rodrigues-Ferreira, M., Vigliano, F.A., Solís-Murgas, L.D. (2013).

Reproductive response of *Gymnotus sp.* to induction with carp pituitary extract. En: Memorias de la IV Conferencia Latinoamericana sobre Cultivo de Peces Nativos, Villavicencio (Colombia). 8 al 11 octubre de 2013.

López, P.A., Sánchez, S., Giménez, H., Barrios, C., Vigliano, F.A. (2017).

Índice gonadosomático en hembras de *Gymnotus omarorum* y su vinculación con la reproducción en cautiverio. En: Libro de Resúmenes del V Simposio Argentino de Ictiología. Corrientes (Argentina). 5 al 7 de setiembre de 2017.

López, P.A., Rodrigues-Ferreira, M., de Oliveira Felizardo, V., Murgas, L.D.S., Vigliano F.A. (2018). Reproductive response of *Gymnotus sp.* (Teleostei: Gymnotiformes) to induction with crude carp pituitary extract. (Manuscrito en preparación).

## Índice de contenidos.

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Resumen</b> _____  | <b>1</b>  |
| <b>Abstract</b> _____   | <b>3</b>  |
| <b>1. Introducción</b> _____  | <b>5</b>  |
| 1.1. Acuicultura y piscicultura _____   | <b>5</b>  |
| 1.2. Producción de especies no destinadas a consumo humano _____  | <b>7</b>  |
| 1.3. Características biológicas e importancia económica de la especie _____                                   | <b>8</b>  |
| 1.4 Regulación de la reproducción _____   | <b>12</b> |
| 1.4.1. Regulación ambiental _____   | <b>12</b> |
| 1.4.2. Regulación neuroendócrina _____  | <b>14</b> |
| 1.5. Características reproductivas del género <i>Gymnotus</i> _____   | <b>18</b> |
| 1.6. Histología gonadal _____   | <b>20</b> |
| 1.7. Factores que afectan la reproducción en peces _____  | <b>21</b> |
| 1.8. Importancia de la reproducción artificial _____  | <b>22</b> |
| <b>Objetivos e hipótesis</b> _____  | <b>26</b> |
| <b>2. Materiales y Métodos</b> _____  | <b>27</b> |
| 2.1. EXPERIENCIA 1. Inducción con extracto bruto de hipófisis (EBH) _____                                     | <b>27</b> |
| 2.2. EXPERIENCIA 2. Inducción con GnRH sintética _____  | <b>29</b> |
| 2.3. EXPERIENCIA 3. Inducción con EBH y GnRH sintética y manejo de<br>variables ambientales _____             | <b>30</b> |
| 2.4. EXPERIENCIA 4. Inducción hormonal en condiciones semi-naturales _____                                    | <b>32</b> |
| 2.5. EXPERIENCIA 5. Evaluación de los efectos de las condiciones de cultivo<br>en el desarrollo gonadal _____ | <b>34</b> |
| 2.6. Análisis estadístico _____   | <b>37</b> |
| <b>3. Resultados</b> _____  | <b>38</b> |
| 3.1. EXPERIENCIA 1. Inducción con extracto bruto de hipófisis (EBH) _____                                     | <b>38</b> |
| 3.2. EXPERIENCIA 2. Inducción con GnRH sintética _____  | <b>40</b> |
| 3.3. EXPERIENCIA 3. Inducción con EBH y GnRH sintética y manejo de<br>variables ambientales _____             | <b>40</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.4. EXPERIENCIA 4. Inducción hormonal en condiciones semi-naturales  | 41        |
| 3.5. EXPERIENCIA 5. Evaluación de los efectos de las condiciones de cultivo en el desarrollo gonadal  | 43        |
| <b>4. Discusión</b>   | <b>55</b> |
| 4.1. Efectos del intervalo entre captura e inducción hormonal y las condiciones ambientales del cautiverio en la reproducción de <i>Gymnotus</i> sp | 55        |
| 4.2. Variables seleccionadas para la evaluación de la reproducción  | 58        |
| 4.2.1. Posición de la vesícula germinal en ovocitos   | 58        |
| 4.2.2. Diámetro de ovocitos   | 59        |
| 4.2.3. Fecundidad absoluta  | 60        |
| 4.2.4. Índice gonadosomático  | 61        |
| 4.2.5. Niveles séricos de LH  | 63        |
| 4.2.6. Parámetros de calidad seminal  | 63        |
| 4.3. Aplicación de diferentes hormonas y protocolos para la reproducción de <i>Gymnotus</i> sp  | 64        |
| 4.4. Efectos del estrés sobre el desarrollo gonadal   | 67        |
| <b>5. Conclusiones</b>  | <b>70</b> |
| <b>6. Referencias bibliográficas</b>  | <b>71</b> |

**Índice de tablas.**

---

|  |           |
|--|-----------|
| Tabla 1.1. Ejemplos de hipofisación en diferentes especies de peces _____  | <b>25</b> |
| Tabla 2.1. Esquemas de inducción hormonal de la experiencia 3 _____  | <b>31</b> |
| Tabla 3.1. Variaciones de la conductividad del agua ( $\text{mS cm}^{-1}$ ) en los tanques entre el inicio de la experiencia 3 y el momento de la inducción hormonal _____   | <b>40</b> |
| Tabla 3.2. Variaciones de la conductividad del agua ( $\text{mS cm}^{-1}$ ) en los estanques entre el inicio de la experiencia 4 y el momento de la inducción hormonal _____ | <b>41</b> |
| Tabla 3.3. Stock de reproductores y captura de juveniles _____   | <b>41</b> |
| Tabla 3.4. Frecuencia relativa de ovogonias y distintos estadios de desarrollo de ovocitos en <i>Gymnotus</i> sp. bajo distintas condiciones de alojamiento _____            | <b>50</b> |
| Tabla 3.5. Frecuencia relativa de los distintos estadios de desarrollo de túbulos seminíferos en <i>Gymnotus</i> sp. bajo distintas condiciones de alojamiento _____         | <b>53</b> |

**Índice de figuras.**

|  |           |
|--|-----------|
| Figura 1.1. Ejemplar adulto de <i>Gymnotus</i> sp. _____   | <b>9</b>  |
| Figura 1.2. Esquema de la regulación neuroendócrina de la reproducción en teleósteos _____   | <b>15</b> |
| Figura 1.3. Esquema de la síntesis de esteroides en teleósteos _____   | <b>17</b> |
| Figura 2.1. Localización del sitio de inyección para inducción hormonal _____  | <b>28</b> |
| Figura 2.2. Unidades de cultivo en condiciones seminaturales utilizadas en la experiencia 4 _____  | <b>33</b> |
| Figura 2.3. Esquemas de muestreos de la experiencia 5 _____  | <b>36</b> |
| Figura 3.1. Valores medios ( $\pm$ SEM) de las variables analizadas en hembras inducidas con EBH _____   | <b>38</b> |
| Figura 3.2. Valores medios ( $\pm$ SEM) de las variables analizadas en machos inducidos con EBH _____  | <b>39</b> |
| Figura 3.3. Juveniles recolectados en los estanques junto con la recuperación de reproductores _____   | <b>42</b> |
| Figura 3.4. Valores medios ( $\pm$ SEM) del diámetro de ovocitos por grupo de tratamiento y días de muestreo _____   | <b>44</b> |
| Figura 3.5. Valores medios ( $\pm$ SEM) de la fecundidad absoluta por grupo de tratamiento y días de muestreo _____  | <b>45</b> |
| Figura 3.6. Valores medios ( $\pm$ SEM) del IGS en hembras por grupo de tratamiento y días de muestreo _____   | <b>46</b> |
| Figura 3.7. Estadios de desarrollo de ovocitos en <i>Gymnotus</i> sp. _____  | <b>47</b> |
| Figura 3.8. Valores medios ( $\pm$ SEM) del número de ovogonias/ovocitos en distintos estadios de desarrollo por grupo de tratamiento _____                  | <b>48</b> |
| Figura 3.9. Valores medios ( $\pm$ SEM) del IGS en machos por grupo de tratamiento y días de muestreo _____  | <b>50</b> |
| Figura 3.10. Estadios de desarrollo de túbulos seminíferos en <i>Gymnotus</i> sp. _____  | <b>51</b> |
| Figura 3.11. Valores medios ( $\pm$ SEM) del número de túbulos seminíferos en distintos estadios de desarrollo por grupo de tratamiento _____                | <b>52</b> |
| Figura 3.12. Distribución de pesos y tallas de los alevines/juveniles de <i>Gymnotus</i> sp. recolectados en los estanques de los tratamientos GL y GE _____ | <b>53</b> |

**Abreviaturas.**

---

EBH: extracto bruto de hipófisis.

GABA: ácido- $\delta$ -aminobutírico.

GE: grupo experimental cultivado en estanques exteriores.

GL: grupo experimental en condiciones de laboratorio.

GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas.

GnRHa: análogos de GnRH.

GTH I: hormona gonadotrofina I.

GTH II: hormona gonadotrofina II.

ICI: Intervalo captura-inducción.

IGS: índice gonadosomático.

LTm: longitud total media.

Pm: peso medio.

%OVGPP: porcentaje de ovocitos con vesícula germinal en posición periférica.

## Optimización de la reproducción de morenas (*Gymnotus* sp.) en condiciones de laboratorio mediante la utilización de diferentes protocolos de inducción hormonal.

**Palabras clave:** *Gymnotus*, reproducción artificial, EBH, GnRH, variables reproductivas, cautiverio

### RESUMEN

*Gymnotus* sp. es ~~la-el~~ principal ~~especie-género~~ utilizado~~a~~ como carnada en la pesca deportiva. Sus poblaciones naturales se encuentran bajo intensa presión de pesca y ~~el desarrollo de cultivos~~ su cría en cautiverio es incipiente. El desarrollo de un paquete tecnológico para la cría en cautiverio adquiere relevancia dada la importancia socioeconómica del ~~género-la especie~~. La posibilidad de manejar artificialmente la reproducción permitiría la producción de alevinos de calidad y en cantidades para abastecer futuras demandas provenientes del desarrollo de la producción de morenas en estanques. La respuesta a la inducción hormonal es uno de los aspectos que se deben estudiar para obtener información que permita elaborar un paquete tecnológico de cría.

Con los objetivos de evaluar la respuesta de *Gymnotus* sp. a inducciones hormonales de la reproducción en condiciones de laboratorio y para determinar un protocolo adecuado a la especie, se aplicaron diferentes dosis y tiempos de administración de extracto bruto de hipófisis (EBH) y un análogo de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH<sub>a</sub>) a grupos de reproductores machos y hembras en diferentes experiencias, en las que se evaluaron distintas variables reproductivas.

En una primera experiencia se analizó la respuesta a la inducción con EBH midiendo índice gonadosomático (IGS) y niveles séricos de hormona luteinizante (LH). Además, se evaluó en hembras el diámetro de los ovocitos y el porcentaje de ovocitos con vesícula germinativa en posición periférica (%OVGPP) y en machos, motilidad y concentración espermáticas. Se obtuvieron desoves sólo en algunas hembras. El %OVGPP y el diámetro de ovocitos fue significativamente superior en las hembras inducidas con EBH en comparación con las hembras del grupo control. Los machos inducidos liberaron escasa cantidad de semen, aunque de calidad satisfactoria.

En las experiencias 2 y 3, se agregaron pruebas de inducción con GnRH<sub>a</sub> y manejo de variables ambientales en laboratorio sin resultados positivos.

En la experiencia 4 se confinaron animales para su adaptación e inducción en condiciones semi-naturales, combinando los efectos de los factores fotoperiodo, temperatura y conductividad del agua, con los de las dosis hormonales propuestas para determinar los efectos de las condiciones de ~~mantenimiento en cautiverio~~ en la maduración y el éxito reproductivo mediante inducción artificial. En estas condiciones, se registraron eventos reproductivos antes de efectuar inducciones hormonales.

En la experiencia 5, se compararon las condiciones semi-naturales (GE) de cautiverio con las condiciones de laboratorio (GL) para evaluar consecuencias del ambiente en el desarrollo gonadal. Se constató que las hembras confinadas en condiciones de laboratorio presentaron un estancamiento del IGS a lo largo de la experiencia, aunque este efecto se revirtió cuando las reproductoras fueron realojadas en los estanques exteriores. En los machos, se pudo observar que los mantenidos en condiciones semi-naturales tuvieron mayor IGS al principio y existió una tendencia de aumento en los alojados en laboratorio cuando fueron trasladados a los estanques.

El diámetro de los ovocitos, al igual que los diferentes estadios ovocitarios reconocidos en cada muestreo, se diferenciaron a lo largo de la experiencia denotando un desarrollo anticipado en las hembras de GE con respecto a las de GL. La fecundidad absoluta de las hembras del GE fue superior a las pertenecientes al GL a partir de los 31 días de iniciada la experiencia. Cuando se evaluaron los estadios ovocitarios, el número de ovocitos vitelogénicos exhibió una reducción significativa en las hembras del GL hasta los 31 días del ensayo respecto al control inicial. En las hembras del GE, se observó un descenso significativo en el número de ovocitos vitelogénicos a los 61 días de ensayo respecto al muestreo del día 31. Por otra parte, resultó llamativo el incremento significativo del número de ovocitos en regresión registrado en GL tras 12 días de confinamiento.

Los machos no mostraron diferencias significativas en la maduración testicular entre tratamientos, y tampoco según el día de muestreo considerado, durante la estación reproductiva en que se analizó esta variable.

Se concluye que la reproducción artificial en *Gymnotus* sp. en ambientes de laboratorio, con las condiciones utilizadas, no resulta factible. No obstante, la estabulación de reproductores en estanques pequeños y condiciones semi-naturales podría constituir una práctica alternativa para obtener varios eventos reproductivos durante la misma temporada en que los reproductores sean extraídos de su ambiente natural.

**Reproduction optimization of banded knifefish (*Gymnotus* sp.) in laboratory conditions using different hormonal induction protocols.**

**Keywords:** *Gymnotus*, artificial reproduction, EBH, GnRH, reproductive variables, captivity.

**ABSTRACT**

*Gymnotus* sp. is the main species-genus used as bait in sport fishing. Their natural populations are under an intensive fishing pressure and the development of this species fish culture is incipient. The development of a technological package for breeding of this species in captivity is relevant due to their socio-economics importance. The management of artificial reproduction would allow the production of fingerlings in quality and quantity. Fingerlings production could supply future demands from emerging species production cultures. The response to hormonal induction is a feature that must be study in order to obtain information that contribute to elaborate a technological breeding package.

The aims of this work were to evaluate the response of *Gymnotus* sp. to hormonal induction of reproduction in laboratory conditions and to determine an appropriate protocol for this species. Different experiences were carried out with crude pituitary extract (CPE) and an analog of gonadotropin-releasing hormone (GnRH<sub>a</sub>) applied to groups of male and female in different doses and times of administration. Different reproductive variables were assessed.

In a first experience, we analyzed the response to CPE induction measuring gonadosomatic index (GSI) and serum levels of luteinizing hormone (LH). In addition, the oocyte diameter and the percentage of oocytes with germinative vesicle in peripheral position (%OGVPP) were evaluated in females and motility and sperm concentration, in males. Spawning were obtained in just few females. The %OGVPP and oocytes diameter were significantly higher in treated females when they were compared with the control group. Treated males released a small amount of semen but it showed satisfactory quality.

In experiments 2 and 3, we added tests with GnRH<sub>a</sub> and manipulation of environmental variables in laboratory facilities without positive results.

In experience 4, animals were confined in semi-natural conditions for their adaptation before hormonal induction. The effects of photoperiod, temperature and water conductivity

were combined with hormonal doses proposed in order to determine the effects of captivity in reproductive success using hormonal induction. Under these conditions reproductive events were recorded before hormonal induction.

In experience 5, semi-natural conditions (GE) and laboratory conditions (GL) were compared in order to evaluate environment influences in gonadal development. GL females suffered GSI stagnation throughout the experience but this effect was inverted when broodstock were relocated in outdoor ponds. GE males had higher IGS at the beginning of the experience and GL group showed an increasing trend when it was transferred outdoors.

GE females denoted an anticipated development in oocyte diameter, as well as in different oocyte stages recognized in each sampling day throughout the experience in comparison with GL females. Absolute fecundity in GE females was higher than GL from the 31 day of experience. Until 31 days of assay, the number of vitellogenic oocytes exhibited a significant reduction in GL females when they were compared with the initial control. At 61 days, GE females showed a significant decrease in number of vitellogenic oocytes compared with the 31<sup>th</sup> sampling day. On the other hand, the number of oocytes in regression phase had a significant increase in GL after 12 days of confinement.

Males showed no significant differences in testicular maturation neither between treatments nor the sampling day considered during the reproductive season analyzed.

Artificial reproduction of *Gymnotus* sp. in laboratory environments is not feasible with the conditions used in this work. However, broodstock extracted from their natural environment could reproduce several times during the same season if they were placed in semi-natural conditions using small ponds.

Con formato: Superíndice

## 1. INTRODUCCIÓN.

---

### 1.1. Acuicultura y Piscicultura.

La acuicultura puede definirse como la actividad de cultivo de organismos, tanto vegetales como animales, cuyo ciclo de vida se desarrolle total o parcialmente en el agua bajo prácticas sustentables que garanticen seguridad alimentaria de acuerdo con una visión ecosistémica para el desarrollo de la producción (FAO, 2010; FAO, 2012).

La actividad ha presentado un crecimiento sostenido y más acelerado que cualquier otro sector de producción de alimentos. Su tasa de crecimiento interanual mundial fue del 8,8% en el período 1980-2010, mientras que la pesca ha crecido a razón del 1,2% y las producciones sobre tierra, no superan el 2,8% (FAO, 2012). Según el informe del estado mundial de la pesca y la acuicultura de la FAO (2016), la pesca entre 2011 y 2014 continuó acumulando un incremento de 1,17% mientras la acuicultura creció a un ritmo de 5,75% durante el mismo periodo.

El crecimiento de la acuicultura en los últimos 30 años ha sido impulsado por la demanda creciente de proteínas de origen animal a nivel mundial, la necesidad de gestionar sosteniblemente los recursos naturales y el estancamiento de la pesca extractiva en las últimas décadas (FAO, 2012).

La producción de la acuicultura a nivel mundial representaba un 19% de la producción de animales acuáticos en 1985. Su volumen se ha multiplicado más de 15 veces desde 1980. El crecimiento de la actividad implicó que para 2014 su producción alcanzara el 44,1% de la producción pesquera total y su contribución al suministro de pescado para consumo humano sea por primera vez mayor que el de la pesca de captura para la provisión del mercado mundial (FAO, 2016).

La producción total de la acuicultura para 2016 ascendió a 73,8 millones de toneladas, comprendiendo 49,8 millones de toneladas de peces, 16,1 millones de toneladas de moluscos, 6,9 millones de toneladas de crustáceos y 1,3 millones de toneladas de otros animales acuáticos incluyendo anfibios (FAO, 2016).

El pescado de cultivo constituye casi el 67,5% de la producción en volumen sobre el total producido por la acuicultura de manera que la piscicultura es la modalidad con mayor producción (FAO, 2016).

En Latinoamérica, el incremento del consumo de pescado junto al crecimiento poblacional, además de la escasez por efectos de la sobrepesca, la contaminación y la modificación de los ecosistemas acuáticos hicieron expandir la piscicultura con especies nativas para mitigar los efectos de la extracción sobre las poblaciones naturales. Por este motivo, el desarrollo de cultivos con especies nativas ha presentado un crecimiento firme y continuado, en particular en Brasil y el Perú. En términos de volumen, la acuicultura en América del Norte y Latinoamérica también es dominada por los peces (62,5%), seguidos de los crustáceos (21,4%) y los moluscos (16,1%) (FAO, 2016). Los principales países productores son Chile, Brasil, México, Ecuador y Colombia, representando el 89-% de la producción acuícola total obtenida.

En Argentina, durante los últimos 20 años la actividad demuestra un desarrollo incipiente, con un crecimiento lento pero sostenido. El volumen de producción continúa siendo pequeño, en torno a las 3300 toneladas en 2016 (Panné Huidobro, 2017).

La piscicultura representa el 78,6% del total de la producción acuícola nacional. El ranking de producción era liderado por la trucha (*Oncorhynchus mykiss*) hasta 2012, cuando fue superada por el pacú (*Piaractus mesopotamicus*) (Ministerio de Agricultura 2010; 2012). El desarrollo del cultivo de pacú restauró los volúmenes de producción que se daban anteriormente y los sobrepasó, alcanzando las 4000 toneladas en 2014. La disminución posterior, observada en 2016 se debió a problemas económicos y financieros sufridos por el sector productivo y en el NEA, región de producción de pacú, particularmente por factores climáticos que afectaron la producción. Esta especie fue responsable del 58,92% de la producción acuícola en 2016 (Panné Huidobro, 2017).

Si bien la acuicultura todavía es considerada una actividad “no tradicional” (Panné Huidobro y Luchini, 2008) en nuestro país, en los últimos años se han ejecutado iniciativas de los Estados nacional y provinciales tendientes a jerarquizar la actividad. Una de las más relevantes la constituyó la aprobación en el año 2015 de la Ley N° 27.231 de “Desarrollo Sustentable del Sector Acuícola”, a través de la cual se promoverá el crecimiento del sector.

## 1.2. Producción de especies no destinadas a consumo humano.

La piscicultura puede ser clasificada en función del objetivo que se plantee para el desarrollo de la producción. Los peces pueden ser reproducidos y terminados para producción de alimento, pero también para producción de peces ornamentales, para pesca deportiva o para repoblamiento de ambientes naturales (Mancera Rodríguez y García, 2008).

El mantenimiento en acuarios de organismos acuáticos ornamentales es un hobby practicado en alrededor de 150 países que se encuentran involucrados en el comercio internacional en torno a esta actividad. Mundialmente son comercializadas aproximadamente unas 5300 especies de agua dulce y al menos unas 1400 especies marinas como peces ornamentales. El principal importador de peces ornamentales es Estados Unidos de Norteamérica, alcanzando los 11 millones de unidades anuales. Comercializa alrededor de 44 millones de individuos anuales en total, con una producción propia que alcanza las dos terceras partes de dicho volumen. Esa producción de 33 millones de ejemplares lo posiciona como principal productor del continente americano (Panné Huidobro y Luchini, 2008; Panné Huidobro, 2013).

En Latinoamérica, se extraen por año de los ambientes naturales más de 100 millones de organismos acuáticos considerados para ornamento, pertenecientes a 400 especies de agua dulce. Entre los países exportadores se destacan los surcados por las cuencas de los ríos Amazonas y Orinoco (Panné Huidobro y Luchini, 2008).

El cultivo de peces ornamentales en Argentina se practica desde hace décadas, aunque ha sufrido los altibajos de las crisis económicas. Los últimos registros disponibles sobre número de organismos acuáticos ornamentales importados y exportados desde la Argentina pertenecen a 2012 y 2013. En el año 2012, Argentina exportó un total de 94.600 peces para ornamento, mientras que en el 2013 esta cifra alcanzó las 146.983 unidades. Los peces provinieron en su mayor parte de cultivo. Las cifras de las importaciones son mayores, ya que en 2012 se importaron 170.270 ejemplares y en 2013, la cifra aumentó considerablemente, alcanzando 582.670, siendo la balanza comercial de la actividad claramente deficitaria. La importación de peces ornamentales fue 95 % superior a la de otros organismos acuáticos ornamentales (Panné Huidobro, 2013).

La producción para pesca deportiva abarca la cría de peces para pesca recreativa, con la finalidad de abastecer establecimientos que funcionan como cotos de pesca, y también de

especies que se utilizan en la pesca deportiva como carnada. En la provincia de Santa Fe, la ley 12212/03 reglamentada por el decreto 2410/04 determina que es obligatorio el registro de todas las actividades relacionadas con la pesca y la acuicultura, entre ellas, acopiadores y vendedores de especies para carnada.

La provincia de Santa Fe cuenta con más de 700 kilómetros de costas sobre el río Paraná. El cauce principal, afluentes y arroyos interiores que la recorren ocupan un total de 300.000 hectáreas. En este ecosistema se desarrolla una intensa actividad pesquera comercial y deportiva. Además de las extensas costas sobre el río, se ve beneficiada por una gran diversidad de especies apreciadas por los pescadores como el dorado (*Salminus brasiliensis*), los surubíes (*Pseudoplatystoma corruscans*, *P. fasciatum*), el manguruyú (*Zungaro jahu*), el pacú (*P. mesopotamicus*), el patí (*Luciopimelodus pati*) o la boga (*Megaleporinus obtusidens*) (Baigún *et al.*, 2003; Bechara *et al.*, 2007; Iwaszkiw y Lacoste, 2011).

Un estudio realizado sobre la región Litoral (Santa Fe, Entre Ríos, Chaco, Corrientes, Formosa y Misiones) en el año 2013 arrojó que un total de 5.618.000 turistas visitaron esta región como destino principal. El un 50,7% se movilizó por motivos de visita a familiares o amigos, y en segundo lugar, el 42,5% lo hizo por ocio, esparcimiento o recreación (Dunjo, 2015).

En la actualidad el Plan A Toda Costa es una acción destinada al desarrollo turístico de la región costera de Santa Fe, incluyendo otros proyectos que impulsen las economías regionales, mediante la generación de diferentes productos y servicios (Ministerio de Gobierno y Reforma del Estado de la Provincia Santa Fe, 2017).

La pesca deportiva ha logrado en los últimos años un papel de privilegio como actividad económica en la región Litoral del país motorizando el turismo. A la par de su crecimiento moviliza demandas de diferentes servicios, siendo la provisión de carnada de fundamental importancia entre ellos. Entre las especies comercializadas como carnada, la morena (*Gymnotus* sp.) es la más importante por el volumen de venta y sus aptitudes como carnada.

### **1.3. Características biológicas e importancia económica de la especie.**

La morena (*Gymnotus* sp., Linnaeus, 1758) es el género de pez cuchillo eléctrico neotropical con rango de distribución geográfico más amplio en el continente americano.

Pertenece al Orden de los Gymnotiformes y la familia Gymnotidae. Se encuentra desde el sur de México hasta la cuenca Paranoplatense. Este género posee el mayor número de especies del orden con un total de treinta y cinco (Cognato y Fialho, 2006; Maxime y Albert, 2009) y es ampliamente conocido por su utilización como carnada en la pesca deportiva (Moraes y Espinoza, 2001; Peixoto Gervásio, 2006).

Los ambientes en donde se encuentra *Gymnotus* sp. son lagunas marginales o áreas inundadas marginales de bahías, arroyos, reflujos y áreas de partes bajas de los ríos que drenan hacia cauces principales, con abundantes plantas acuáticas de raíces densas, que retienen mucha materia orgánica proveniente de las inundaciones, donde se esconde y encuentra alimento. Posee hábitos nocturnos saliendo en el crepúsculo hacia aguas más abiertas (Barbieri y Barbieri, 1983). Habita en lugares con profundidades inferiores a un metro. Ejemplares pequeños, con tamaños entre 4 y 6 cm, se hallan entre las raíces de macrófitas acuáticas en profundidades inferiores a 50 cm (Rotta, 2004).

Los peces del género *Gymnotus* presentan un cuerpo anguiliforme, elongado, cilíndrico en la región anterior, comprimido latero-lateralmente en la región posterior y que finaliza en punta ya que no presenta aleta caudal. Están desprovistos de aletas dorsal y ventral, pero poseen una larga aleta anal que se inicia un poco por detrás de las aletas pectorales y se extiende por casi toda su parte ventral hasta casi el extremo del cuerpo (Figura 1.1.) (González *et al.*, 2001).



**Figura 1.1. Ejemplar adulto de *Gymnotus* sp.**

La cabeza es deprimida dorsoventralmente y la quijada inferior es saliente. El hocico es romo y presenta las narinas anteriores en el borde de las quijadas, casi ocultas por el labio inferior. Posee una amplia abertura bucal. Los dientes orales cónicos y la cavidad bucofaríngea con escaso desarrollo del aparato dentario faríngeo y de los radios branquiales son

característicos de peces que poseen una alimentación poco especializada. Bonetto *et al.* (1978), caracterizaron a *Gymnotus carapo* como planctófago, micro y mesoanimalívoro. El espesor de los labios, sugiere que auxiliarían en la selección y captura de organismos retirados del fondo pues en el contenido gástrico se verificó apenas una pequeña cantidad de partículas de substrato y restos vegetales ingerida junto con los insectos, crustáceos y moluscos que constituyen parte del espectro alimentario de esta especie, así como animales de pequeño porte, renacuajos de anfibios y peces (González *et al.*, 2001; Rotta, 2004).

No posee características sexuales secundarias definidas. El macho posee dos testículos ovoides ubicados detrás del extremo caudal del conjunto visceral, con conductos individuales que se dirigen hacia la parte ventral anterior del cuerpo y se unen en la papila genital. La hembra tiene un único ovario que se divide en dos lóbulos en dirección al extremo cefálico, de los cuales parten dos oviductos hacia la papila genital. La abertura genital se encuentra ubicada por debajo de la cabeza a la altura del borde inferior de la abertura branquial, detrás del ano (González *et al.*, 2001; Ringuet *et al.*, 1967). Posee órganos eléctricos reducidos que emiten una pequeña descarga, generando un campo eléctrico que utiliza para electrocomunicación y orientación, así como para la búsqueda de alimento en compensación por su visión reducida (Rotta, 2004). Este sistema le otorga capacidad para el hábito nocturno, cuando la visión es menos eficiente y la presión predatoria es menor (Caputi *et al.*, 2008; Markham *et al.*, 2009), a la vez que permite a los individuos distinguir sexo y edad de ejemplares de la misma especie debido a la variación del patrón de los pulsos eléctricos a diferentes edades y entre sexos (Cognato, 2005; Cognato y Fialho, 2006; Moller *et al.*, 2004).

*Gymnotus* sp. es ~~la especie~~ el género más utilizado~~o~~ como carnada para la pesca de grandes peces carnívoros de río abierto en el noreste y litoral de la República Argentina debido a que se encarna fácilmente por su extremidad caudal. Además, tiene la capacidad de respirar aire atmosférico por lo que puede mantenerse durante días en buenas condiciones para su utilización. Hasta el presente, todos los ejemplares comercializados son obtenidos del medio natural (Almirón *et al.*, 2008). Si bien no existen registros de comercialización anual total, cabe mencionar a modo de ejemplo lo que ocurre en concursos de pesca como los de Reconquista (Santa Fe) y Goya (Corrientes), donde participan alrededor 500 embarcaciones. Cada equipo utiliza alrededor de seis docenas de morenas, alcanzando un consumo total aproximado de 72.000 ejemplares por año solo entre estos dos concursos. Además de estos concursos existen otros veinte eventos más que se realizan anualmente en distintos lugares de Corrientes, Entre

Ríos y Santa Fe, donde también se utilizan entre otras carnadas, las morenas. Cabe resaltar además, la existencia de numerosos puestos de venta de carnadas a la vera de las rutas de acceso a los diferentes pesqueros en toda la región litoral. En Brasil, la morena es también la carnada más utilizada para la pesca de las especies carnívoras, contribuyendo en un 50% a la captura total de carnadas registrada en la región del Pantanal (Mato Grosso do Sul), la cual se calcula en unos 15 millones de ejemplares al año (Rotta, 2004).

La extracción de carnadas se desarrolla a la par de la pesca deportiva, siendo una actividad económica de sustento para los pescadores conocidos como “moreneros”. El crecimiento del turismo relacionado con la pesca deportiva en la región del litoral argentino lleva aparejada una elevación de la presión de pesca sobre este recurso. La pesca deportiva es una actividad turística consumista que puede conducir a una drástica reducción de las poblaciones naturales de morenas por sobreexplotación (Peixoto Gervásio, 2006).

Uno de los grandes problemas en el comercio de carnadas utilizadas para la pesca deportiva en Mato Grosso do Sul ha sido la mantención de las mismas en cautiverio después de su captura hasta la comercialización. En principio, los parámetros físico-químicos del agua no parecen ser factores limitantes para la conservación de las morenas en cautiverio ya que debido a su respiración aérea accesoria consiguen sobrevivir con bajas concentraciones de oxígeno disuelto. Las mortalidades parecen estar relacionadas con la forma de manejo. El transporte, la alta densidad en que se confinan los ejemplares y la luz del sol directa sobre los tanques, con el consecuente deterioro de la calidad del agua, producirían estrés crónico en los animales (Soares de Oliveira *et al.*, 2004). Según Rotta (2004), las mortalidades producidas como consecuencia de las colectas, almacenamiento y transporte ascienden al 14% de las capturas en la región del Pantanal.

La oferta de morenas presenta una marcada estacionalidad porque depende fundamentalmente del nivel de agua de los bañados, así como de la temperatura del agua condicionada por la época del año.

La necesidad de contar con carnadas en cantidades suficientes para la temporada de pesca adquiere importancia debido al auge de la pesca como actividad turística en la región litoral de la Argentina. Como este deporte trae aparejada una fuerte presión de extracción sobre las diferentes especies de morena los moreneros padecen los vaivenes de la fluctuación entre oferta-demanda.

Con este escenario, la posibilidad de realizar la reproducción en cautiverio y criar ejemplares en estanques, aparece como alternativa que permitiría reorganizar la actividad, mejorar la condición socioeconómica de los pescadores moreneros y la atención a los turistas que practican la pesca deportiva, y al mismo tiempo, constituir un aporte para la preservación de las poblaciones naturales.

#### **1.4. Regulación de la reproducción.**

##### ***1.4.1. Regulación ambiental.***

La época de reproducción de una especie está determinada por diferentes factores ambientales que activan el proceso de maduración de las gónadas actuando a nivel del hipotálamo. Carrillo *et al.* (2009) clasifican a estos factores ambientales como factores próximos y factores últimos.

Los factores próximos controlan los ciclos anuales de una especie afectando sus procesos biológicos. Estos son las señales ambientales de las cuales, los individuos obtienen información sobre la estación venidera para sincronizar los eventos reproductivos con anticipación. Por otra parte, los factores últimos son las variables ambientales que han ejercido presión de selección para restringir la actividad reproductiva a determinado momento del año que coincide generalmente con la época de mayor disponibilidad de alimento. Dado que el fin del proceso reproductivo es asegurar la continuidad de la especie, la actividad reproductiva de las especies se ajusta al período en que la prole puede desarrollarse con menores dificultades (Carrillo *et al.*, 2009).

El factor proximal predictivo más importante en la maduración de la mayoría de las especies de peces cultivadas es el fotoperiodo debido a que permanece constante reflejando la estacionalidad de manera fiable. La información del fotoperiodo es transferida por el órgano pineal mediante la producción de melatonina y en menor medida por la retina, mediando los ritmos circadianos y estacionales. Ya fueron descritos ritmos de producción de melatonina tanto para especies dulceacuícolas como marinas. En todas ellas, los niveles de melatonina plasmática se elevan durante la noche y disminuyen durante el día. Estos cambios cíclicos diarios en la secreción de melatonina le suministran al individuo información acerca de la hora del día y también experimenta variaciones estacionales, relacionadas con la duración de la

noche y la temperatura del agua, que le informan sobre la época del año en que se encuentra (Carrillo *et al.*, 2009).

La temperatura es uno de los factores últimos para una sincronización exacta del momento de la reproducción con los cambios periódicos que provienen del medio ambiente exterior dado que propicia el momento en que las larvas pueden desarrollarse mejor. Este parámetro del agua comienza su incremento en primavera en latitudes medias y altas, con lo que aumenta la actividad de los peces y las posibilidades de conseguir mayor cantidad de alimento. En áreas tropicales y subtropicales, el régimen de lluvias y las corrientes oceánicas tienen mucha influencia modificando la temperatura de manera que ésta pareciera regir la reproducción (Carrillo *et al.*, 2009). En aguas continentales, el régimen de lluvias determina los pulsos de inundación y sequía. Los cambios del nivel fluviométrico tienen influencia en la modificación de los parámetros físicos y químicos del agua, como conductividad eléctrica y pH, y sobre otras condiciones como materia orgánica disuelta, acceso a lugares de cría en el valle aluvial, presencia de predadores o la competencia por el alimento (Vazzoler, 1996).

Tanto, el factor proximal más importante, el fotoperiodo, como los factores últimos, como temperatura, conductividad y nivel del agua, han sido utilizados en diferentes especies subtropicales para regular la respuesta reproductiva en cautiverio (Feulner *et al.*, 2008).

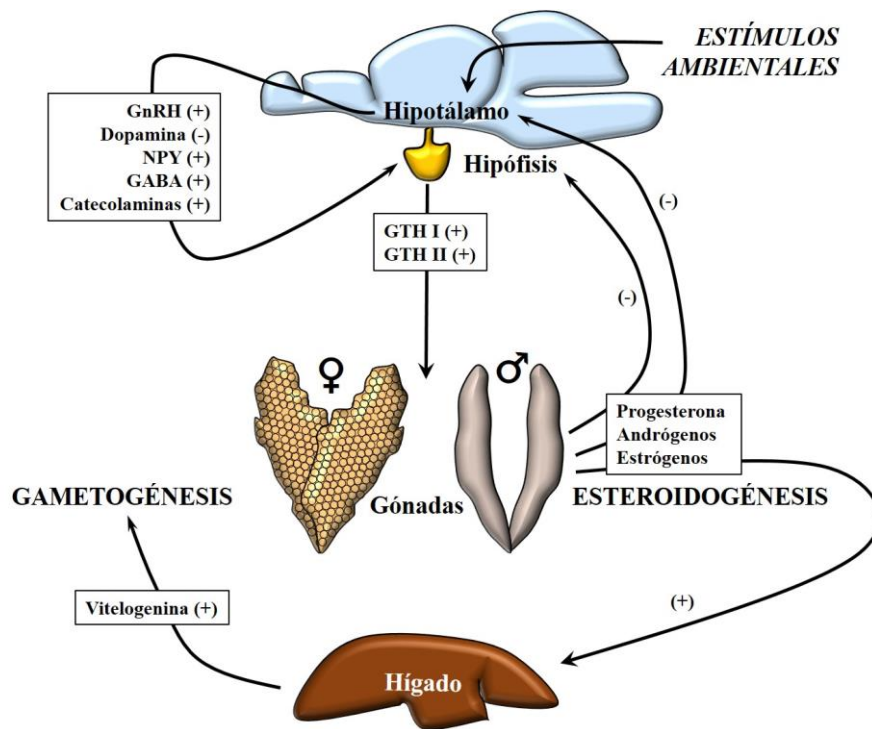
Varias especies de peces tropicales de agua dulce fueron reproducidas en cautiverio mediante la aplicación de cambios en factores medioambientales. Las condiciones de laboratorio permitieron emular precipitaciones, cambiar la conductividad y el nivel del agua, imitando de esa manera la sucesión de la estación seca con la de lluvias que se da en las latitudes de origen de las mismas. Las experiencias incluyeron siete especies de Gymnotiformes sudamericanos. La mayoría de los experimentos fueron realizados con *Eigenmannia lineata*, utilizando cambios en los tres factores ambientales mencionados. Al comienzo, se imitaron las condiciones de la estación seca y luego se simuló la época de creciente con la imitación de lluvia mediante spray elevando el nivel que contenían las peceras. De esta manera, se disminuyó simultáneamente la conductividad y se obtuvieron puestas sucesivas, demostrando que *E. lineata* posee desova parcelada con 2 a 5 días de intervalo entre puestas. En 10 experimentos de cruzamiento, utilizando diferentes proporciones entre sexos de los reproductores y el mismo patrón de variación de los tres factores ambientales, se produjeron 196 puestas. Los experimentos con otras especies de Gymnotiformes se realizaron usando diferentes

combinaciones de los 3 factores ambientales utilizados previamente, tomando las puestas o la detección de larvas como indicación de maduración completa de las gónadas. En *Sternopygus macrurus* y *Apteronotus albifrons* se obtuvieron 2 y 3 desovas, respectivamente, después de aplicar cambios a los tres factores ambientales. Mientras, en *Apteronotus leptorhynchus*, *Rhamphichthys* sp., *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y *Brachyhypopomus brevirostris* sólo se necesitaron el descenso de conductividad y cambio del nivel del agua para obtener desovas (Kirschbaum *et al.*, 2008).

#### **1.4.2. Regulación neuroendócrina.**

Los estímulos ambientales que modulan el proceso de maduración de las gónadas en la época de reproducción activan el sistema neuroendócrino dominante en la regulación del proceso reproductivo, el eje hipotalámico-hipofisiario-gonadal. Otros sistemas intermediarios, proyecciones pineales y retinianas, integran las informaciones neurales y neuroendócrinas del fotoperiodo y las hacen llegar a sistemas efectores que responden liberando neurohormonas como la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y la dopamina (Carrillo *et al.*, 2009).

Los peces teleósteos no poseen eminencia media por lo que la GnRH es transportada directamente a las células del lóbulo anterior adenohipofisiario. La GnRH desencadena una serie de cascadas endócrinas que modulan la actividad de la hipófisis y que conducen a la reproducción (Kah *et al.*, 1993; Trudeau, 1997). La GnRH estimula y la dopamina inhibe la síntesis y secreción de gonadotropinas (GTH) hipofisarias (Fig. 1.2.). En peces, la GTH I y la GTH II son análogas a la hormona folículoestimulante y la hormona luteinizante de tetrápodos, respectivamente. Estas dos GTH que secreta la hipófisis son las responsables de la recrudescencia gonadal, regulando la gametogénesis y la esteroideogénesis por acción directa sobre las gónadas (Chaube *et al.*, 2015), así como en otros procesos implicados indirectamente en la reproducción como la vitelogénesis. GTH I induce la síntesis de estradiol e interviene en la regulación de la incorporación de vitelogenina por el ovocito. La GTH II también tiene efectos en la maduración final, ovulación y la puesta (Mommensen y Korsgaard, 2008), así como en la espermiación, probablemente modulando la composición del plasma seminal (Planas y Swanson, 2008).



**Figura 1.2. Esquema de la regulación neuroendócrina de la reproducción en teleosteos.**

La acción de las GTH sobre las gónadas se ejerce a través de su acoplamiento a receptores de membrana específicos localizados en las células foliculares del ovario y en las células de Leydig y Sertoli en el testículo. El acoplamiento de las GTH a sus receptores específicos desencadena la esteroidogénesis gonadal responsable de la producción de andrógenos, estrógenos y progestágenos que, a su vez, promueven la espermatogénesis y ovogénesis. Los niveles de ambas GTH en la hipófisis y en el plasma de los teleosteos varían entre machos y hembras a lo largo del ciclo reproductor desde la recrudescencia gonadal hasta el desove en la mayoría de los teleosteos (Carrillo et al., 2009) (Carrillo et al., 2009) (Carrillo et al., 2009) (Carrillo et al., 2009) mostrando una secreción paralela de ambas GTH involucradas en la regulación endocrina exceptuando a los Siluriformes, que parecen mostrar otro patrón con solo GTH II presente durante el proceso de maduración gonadal (Chaube *et al.*, 2015).

GTH I, presente a lo largo de todo el ciclo, incrementa su concentración en plasma de forma notable durante la oogénesis y espermatogénesis tempranas y después de la ovulación y la espermiogénesis (Carrillo *et al.*, 2009). Es responsable de estimular la síntesis de estrógenos en el ovario, los que a su vez estimulan la síntesis de la vitelogenina en el hígado, la cual luego será transportada hasta los ovarios donde será incorporada a los ovocitos en maduración constituyendo la reserva de vitelo de los futuros embriones (Pankhurst, 2008). GTH I también actúa como la hormona que desencadena la maduración final y ovulación, estimulando la producción de GTH II. En los machos regula la proliferación de las espermatogonias y su diferenciación acompañada por las células de Sertoli (Hoo *et al.*, 2016).

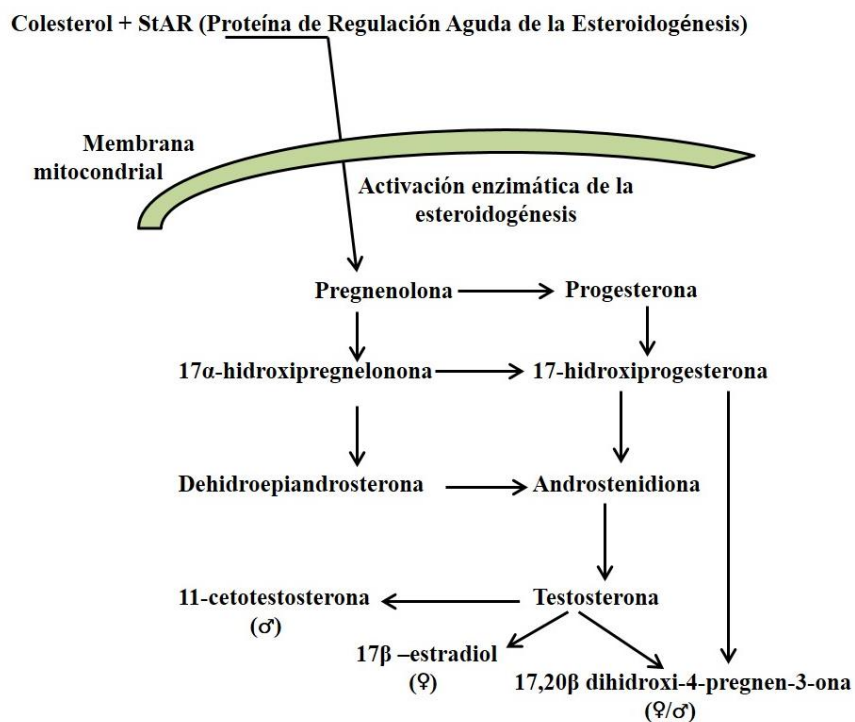
GTH II se caracteriza por mostrar un pico durante la fase de maduración final y ovulación en hembras, y la espermiogénesis y espermiación en machos. Bajo la acción de esta GTH la producción de estrógenos por el ovario cambia a progesterona y los ovocitos quedan aptos para la ovulación (Muñoz Cueto, 2009).

Por otra parte, la dopamina inhibe la secreción de GTH I y GTH II bloqueando el proceso reproductivo. Las acciones de la dopamina están moduladas por los esteroides sexuales, en particular, por el estradiol formando parte de los mecanismos de retroalimentación negativa de los esteroides durante los estadios de vitelogénesis y de los andrógenos sobre neuronas dopaminérgicas del área preóptica que proyectan a la hipófisis (Muñoz Cueto, 2009).

La acción de las GTH desencadena la maduración en peces uniéndose a receptores de membrana, cada una asociada a diferentes estadios del desarrollo gonadal. La esteroidogénesis comienza, mediada por la proteína de regulación aguda de la esteroidogénesis, con la transferencia de colesterol a la membrana interna de las mitocondrias para formar el primer esteroide en la vía de síntesis, la pregnenolona (Fig. 1.3.). Esta puede seguir dos rutas diferentes, a progesterona o  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona. El punto final de la síntesis de esteroides durante la gametogénesis es  $17\beta$ -estradiol y 11-cetotestosterona, en hembras y machos, respectivamente. En ambos sexos, se produce un cambio a la producción de  $17,20\beta$  dihidroxi-4-pregnen-3-ona sintetizada por las células foliculares en hembras y por células de Leydig en machos, antes de la maduración de los gametos, la ovulación y la espermiación. Los esteroides tienen acción endócrina vía circulación sobre órganos diana y parácrina por difusión directa dentro de las células adyacentes. Los progestágenos tienen actividad en la maduración de ambos sexos y actúan como feromonas en muchas especies. Los andrógenos regulan el crecimiento de los

Con formato: Fuente: Cursiva

testículos y el desarrollo de características sexuales secundarias, además en ambos sexos, intervienen regulando patrones de comportamiento y tienen acción en el mecanismo de retroalimentación central (Fig. 1.2.). Además, la testosterona es precursora del  $17\beta$ -estradiol, responsable de la estimulación de la síntesis del vitelo y precursores de la envoltura del huevo, también con acción en el mecanismo de retroalimentación central y local (Pankhurst, 2008).



**Figura 1.3.** Esquema de la síntesis de esteroides en teleósteos (modificado de Pankhurst, 2008).

En el control de la reproducción también están implicados otros sistemas neuroendócrinos. Entre ellos, el neuropéptido Y (NPY), implicado en el control de la ingesta y el metabolismo, y el ácido- $\delta$ -aminobutírico (GABA), principal neurotransmisor inhibitorio en el

cerebro de vertebrados. Ambos poseen efectos estimuladores sobre la secreción de GTH en forma directa y también sobre la liberación de GnRH (Muñoz Cueto, 2009).

Las neuronas secretoras de NPY, fueron localizadas en las placodas olfativas, el bulbo olfatorio, la porción central del telencéfalo dorsal, el telencéfalo ventral, el área preóptica caudal, el tálamo, el techo óptico, el núcleo entopeduncular y el locus cerúleo, siendo estos dos últimos los que proyectan sus axones hasta la hipófisis para establecer contacto directo con las células gonadotropas (Muñoz Cueto, 2009).

Por otra parte, el GABA estimula la liberación de GnRH en los terminales nerviosos de la hipófisis e inhibe la actividad de las células secretoras de dopamina (Muñoz Cueto, 2009).

### **1.5. Características reproductivas del género *Gymnotus*.**

El ciclo reproductivo en peces difiere de acuerdo a la estrategia reproductiva de la especie. La maduración de las gónadas durante la época de reproducción puede presentar desarrollo sincrónico o asincrónico. Esta diferencia se evidencia en las hembras de manera que, si la especie posee maduración sincrónica los ovocitos que continúan la diferenciación celular se encuentran en el mismo estadio y en caso de que la maduración sea asincrónica, se encontrarán grupos en diferentes fases de desarrollo (Vazzoler, 1996).

*Gymnotus* sp. es una especie de desove asincrónico o parcelado caracterizado histológicamente por ovarios con grupos de ovocitos en diferentes estadios de maduración que son desovados en varios lotes durante un mismo período reproductivo (González *et al.*, 2001; Rotta, 2004).

Estudios realizados por Kirschbaum y Wieczorek (2002) revelaron que la disminución de la conductividad del agua es el factor climático sincronizador que actúa como gatillo sobre el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal para el desarrollo total de las gónadas y el desove en *G. carapo*. Estos investigadores obtuvieron los primeros datos de reproducción de *Gymnotus* en acuarios, disminuyendo la conductividad del agua continuamente a lo largo de varias semanas mediante el agregado de agua destilada para provocar la maduración gonadal. Pudieron obtener una puesta de huevos 120 días después de comenzar el experimento usando un fotoperiodo controlado de 12 horas luz:12 horas oscuridad como factor proximal, mediante el cual los peces advierten que se encuentran en época favorable para la reproducción. El

agregado de agua destilada se efectuó sin simular la ocurrencia de lluvias como factor último de maduración.

La recrudescencia de las gónadas en la mayoría de las especies de peces neotropicales de agua dulce comienza durante la estación primaveral (Vazzoler, 1996), dando lugar al paulatino aumento de la relación gonadosomática que refleja eficientemente la inversión de energía realizada para la reproducción (Lubzens *et al.*, 2010). Barbieri y Barbieri (1983) hallaron que el período de la reproducción para la especie se extendía desde septiembre a enero, con pico entre octubre y diciembre, coincidiendo con la época de elevación de la temperatura del agua en la represa de Lobo (SP, Brasil).

En estudios realizados en el sur del Pantanal (Brasil) las hembras de *Gymnotus* se encontraron maduras, en diferentes frecuencias, entre los meses de diciembre y abril (Resende *et al.*, 2006). González *et al.* (2001) encontraron animales maduros desde octubre a marzo en una laguna en inmediaciones de Corrientes (Argentina). También en el bajo río Negro (Pantanal- MGS, Brasil) se describió un período reproductivo desde diciembre extendido hasta abril (Resende *et al.*, 2006). Ishiba *et al.* (2009), analizando histológicamente morenas provenientes del río Bonito (SP, Brasil) encontraron machos maduros entre octubre y abril, mientras que las hembras de la misma población presentaron su madurez entre septiembre y febrero. La temporada reproductiva de *Gymnotus omarorum* en laguna Blanca (Formosa, Argentina) demostró ser igual de extensa, desde el inicio de la primavera hasta inicios del otoño. Las hembras presentaron gónadas en estado de maduración con un pico en septiembre, previo al desove. El pico del estado desovado fue en octubre (78%). Sin embargo, desde octubre hasta marzo, los estadios de maduración avanzada, total y desovado se presentaron durante todo el período de reproducción (Iwaszkiw *et al.*, 2016).

La fecundidad en morenas por lote de desova es baja, variando de 820 a 3.040 ovocitos en hembras de 23 a 46 cm de longitud total. Asimismo, la fecundidad absoluta, estimación de la cantidad total de ovocitos desovados a lo largo de un período reproductivo, se calculó que varía entre 990 y 272.700 ovocitos (Rotta, 2004). En base a la baja fecundidad detectada en las hembras con ovarios maduros, determinada a partir del escaso número de ovocitos listos para ser desovados, se infieren comportamientos asociados a cuidados parentales como los que se presentan en aquellas especies de peces que utilizan estrategias similares a las encontradas en *Gymnotus* (González *et al.*, 2001). Kirschbaum y Wieczorek (2002) pudieron documentar que

el macho de *Gymnotus* carga las crías en su boca durante los primeros momentos de su desarrollo. Los juveniles que fueron descargados por el macho en un acuario fueron aislados en el mismo y criados hasta las 15 semanas de edad. Luego, fueron pescados para contarlos y clasificarlos. Al año de edad los ejemplares alcanzaron 20 cm de longitud promedio. No se pudo constatar hasta que edad el macho cuida de las crías debido su aislamiento temprano, poco después del comienzo de la alimentación exógena. Sin embargo, el tamaño y la agresividad de *Gymnotus* son buenas condiciones para que el cuidado parental de las crías se prolongue un tiempo más luego del comienzo de la alimentación exógena de las mismas.

#### **1.6. Histología gonadal.**

Las características morfológicas que pueden ser utilizadas en la determinación de las diferentes fases del período reproductivo de una especie se deben a cambios histológicos que se dan en las gónadas a lo largo del mismo (Ishiba *et al.*, 2009). Estos autores, de acuerdo a la clasificación de Grier (2002) y Grier y Uribe (2009), describieron para *G. carapo* cinco fases de desarrollo gonadal para machos: en retracción, desarrollo inicial, desarrollo intermedio, desarrollo final y regresión, y tres fases en las hembras: desarrollo inicial, desarrollo intermedio y desarrollo final.

En machos, la fase de testículos en retracción se encuentra durante junio. Se caracteriza por un epitelio germinativo continuo, formado apenas por espermatogonias y células de Sertoli. La luz tubular se mantiene dilatada y contiene espermatozoides residuales. En desarrollo inicial, desde julio a agosto, el epitelio germinativo es continuo, formado por grupos de espermatogonias y espermatocitos. La proliferación de los grupos hacia el lumen convierte al epitelio en pseudoestratificado y la luz de los túbulos, con algunos espermatozoides residuales, se observa parcialmente cerrada. El desarrollo intermedio, desde agosto a octubre, se caracteriza por grupos que contienen células más diferenciadas, espermatocitos y espermátidas, en posición apical hacia la luz, mientras que los grupos con células germinativas menos diferenciadas (espermatocitos y espermatogonias) ocupan una posición más basal. El epitelio germinativo es predominantemente continuo y el intersticio reducido. Durante el desarrollo final, de octubre a abril, la luz de los túbulos se presenta irregular y dilatada, llena de espermatozoides. El epitelio germinativo se torna discontinuo con la abertura gradual de los túbulos. La regresión, desde abril a mayo, se caracteriza por el epitelio germinativo discontinuo con grupos remanentes

vacuolados y el intersticio engrosado. Una gran cantidad de macrófagos aparece en la luz tubular, irregularmente llena de espermatozoides. En esta fase, los testículos sufren un cambio estructural con la aparición de centros de melanomacróforos (Ishiba *et al.*, 2009).

En las hembras de *Gymnotus*, se describieron tres fases del período reproductivo determinadas por la frecuencia relativa de tipos de ovocitos presentes. Durante el desarrollo inicial, desde marzo a mayo, se observa un epitelio germinativo con nidos de ovogonias y ovocitos pre-vitelogénicos de diferentes tamaños. En esta primera fase de desarrollo, se puede observar el aumento en diámetro del ovocito envuelto por células foliculares pavimentosas. Durante la fase de desarrollo intermedio, de junio a agosto, los ovocitos ya presentan alvéolos corticales en el final del crecimiento primario y se ven recubiertos por la zona radiata, células foliculares cúbicas, la membrana basal y las tecas interna y externa. Por último, en el periodo de desarrollo final, desde septiembre a febrero, los ovocitos se encuentran en crecimiento secundario, caracterizados por el acúmulo de vitelo en el citoplasma. Los ovocitos maduros (vitelogénicos) son liberados por ruptura de la envoltura folicular, formando los complejos foliculares post-ovulatorios, encontrados desde diciembre a febrero. Los ovocitos no viables sufren atresia folicular, caracterizada por la presencia de una gran cantidad de macrófagos en la cercanía del folículo atrésico (Ishiba *et al.*, 2009).

### 1.7. Factores que afectan la reproducción en peces.

El proceso de reproducción se ve afectado por diferentes circunstancias causantes de estrés cuyos efectos fisiológicos guardan estrecha relación con el mismo (Schreck *et al.*, 2001). Diferentes investigaciones han demostrado que el estrés por manejo puede afectar de distintas formas el desempeño reproductivo en diferentes especies de peces, atrasando o adelantando la ocurrencia del período reproductivo o hasta inhibiendo completamente la reproducción (Schreck, 2010). En muchas especies bajo régimen de cultivo falla la maduración final de los ovocitos aparentemente por la falta de liberación de GTH II desde la hipófisis en la última etapa de la vitelogénesis y como consecuencia no se dan la ovulación y ~~la puesta~~ el desove (Mylonas *et al.*, 2010).

Como fue descrito en el apartado 1.4, la regulación del ciclo reproductivo se encuentra coordinada bajo control de múltiples hormonas. El eje hipotalámico-hipofisario-gonadal integra señales endógenas que recibe de las glándulas endocrinas al ser estimuladas por el

medioambiente. Por lo tanto, la reproducción en los teleósteos está bajo la influencia de la retroalimentación ejercida por el sistema endocrino sobre los órganos diana, pero también por todos los cambios que tengan impacto sobre el ambiente, como temperatura, fotoperiodo, disponibilidad de alimento y agentes estresantes, entre otros (Mommsen y Korsgaard, 2008).

Un agente estresante produce una alteración en la homeostasis induciendo la liberación de catecolaminas y cortisol. En teleósteos, las catecolaminas son secretadas por las células cromafines y el cortisol es sintetizado y secretado por las células esteroideogénicas (Barton e Iwama, 1991). Ambos tipos celulares se localizan alrededor de las principales venas de la porción cefálica del riñón conformando las glándulas interrenales (Morandini *et al.*, 2014). El riñón de los peces es un órgano complejo donde se localizan, además de las glándulas interrenales, las estructuras vinculadas a los procesos de excreción de metabolitos, células hematopoyéticas y centros de melanomacrófagos (Matty, 1985; Vigliano *et al.*, 2006).

Entonces, la ocurrencia de estrés en peces se puede detectar mediante la utilización de algunos indicadores histopatológicos que se pueden tomar como variables cuantitativas, demostrando diferencias entre individuos que manifiestan o no manifiestan estrés. Los métodos más utilizados son medición de las células esteroideogénicas de la glándula interrenal y de sus núcleos y el peso de los riñones que refleja indirectamente el tamaño de las glándulas interrenales. Morandini, *et al.* (2014) estudiaron la correlación de estas variables morfométricas con los niveles de cortisol plasmático utilizando como modelo a *Cichlasoma dimerus*, una especie que presenta comportamiento territorial. Así, los machos no territoriales o dominados de un acuario presentaron un área nuclear mayor de sus células esteroideogénicas correlacionada positivamente con mayores niveles de cortisol en plasma que los machos territoriales o dominantes. Otro parámetro que fue asociado a efectos de estrés en varias especies de teleósteos es la presencia de células rodlet en diferentes órganos (Auró y Ocampo, 1999).

### **1.8. Importancia de la reproducción artificial.**

Si bien *Gymnotus* sp. se reproduce en cautiverio (de Souza y de Andrade, 1984), la supervivencia de los alevinos en condiciones normales dentro de los estanques puede ser baja para un sistema productivo debido al canibalismo entre diferentes tamaños de ejemplares. Existen dos soluciones posibles a este problema.

La primera consiste en separar los alevinos durante la época de reproducción. Son varias las dificultades inherentes a este método; debido a la gran superficie de los estanques de cría hay que dedicar mucho tiempo a la recolección. La producción de alevinos para recría depende totalmente del desove natural en los estanques de reproductores y además, con este manejo se produce estrés sobre el plantel de reproductores con la constante pesca para remover semanalmente las crías durante la época de reproducción.

La segunda solución la constituye el desarrollo de la reproducción artificial para esta especie. Mediante este método se evitarían el canibalismo por parte de los progenitores y la situación de estrés producida sobre ellos por las pescas en procura de crías. De esta manera, podría contarse con alevinos de calidad y en cantidades para abastecer futuras demandas de semilla, sin tener que destinar grandes extensiones a mantenimiento de reproductores.

La reproducción artificial en peces tiene sus orígenes en los trabajos pioneros de Houssay en 1930, con la inducción a la ovulación en el orillero o madrecita, *Cnesterodon decemmaculatus* (Poeciliidae), mediante inoculación intraperitoneal de un extracto de glándulas pituitarias de *Prochilodus platensis* (Juárez-Palacios, 1989). La implementación de esta técnica recibe el nombre de hipofisación y consiste en la aplicación de extracto de hipófisis obtenido por maceración de glándulas extraídas de peces donadores que deben ser adultos y estar en estadio de maduración gonadal avanzado o maduros (Castagnolli, 1992). Este método fue empleado por numerosos autores en diferentes especies de peces con interés económico, aún en especies que se reproducen en cautiverio permitiendo un aprovechamiento más eficiente del período de reproducción (Juárez-Palacios, 1989).

La inducción hormonal de la desova es el único método seguro para obtener reproducciones en especies de peces que no desovan en condiciones de cultivo por falta de estímulos externos, dada la imposibilidad de reproducir las condiciones ambientales para la liberación de gametos. La técnica de inducción hormonal ha sido utilizada desde hace más de 60 años para diferentes especies de peces utilizando los mismos procedimientos, sólo con algunas modificaciones menores (Rottmann *et al.*, 1991). Estas modificaciones en los protocolos de inducción se realizan según la biología reproductiva característica de cada especie. La inducción puede realizarse de forma aguda, utilizando pocas dosis de alta concentración, o crónica, con dosis múltiples con baja concentración de hormona por períodos prolongados.

La hipofisación es una técnica de inducción aguda de la reproducción, extensamente difundida y utilizada desde que comenzó a ser aplicada y adaptada a diferentes especies por Ihering y Azevedo (1934; 1936) en Brasil. Utilizando esta técnica, con el protocolo desarrollado por Ihering (1937) asociado a las adaptaciones propuestas por (Woyanovich y Hórvath, 1980), fueron inducidas artificialmente a la desova veintidós especies de la cuenca del río San Francisco (Minas Gerais, Brasil) en el periodo desde 1953 a 2000, por diferentes investigadores (Fontenele, 1953, 1955; Garádi y Nunes, 1986; Sato, 1988, 1999; Sato *et al.*, 1996; 1997; 1998; 2000) . Los peces fueron inyectados con extracto bruto de hipófisis (EBH) de carpa en la cavidad celómica o bien, intramuscularmente. Los machos generalmente recibieron una dosis única, que varió entre 2,5 y 3 mg kg<sup>-1</sup> de EBH de carpa. Las hembras fueron inyectadas dos veces, una primera dosis preparatoria y la segunda desencadenante, con 0,6 a 1,1 y 5,0 a 6,6 mg kg<sup>-1</sup> de EBH de carpa, respectivamente separadas entre sí por un período entre 12 a 20 horas (Sato *et al.*, 2003). Otros autores que trabajaron con extractos hipofisarios, incluso provenientes de otros animales, se detallan en la tabla 1.1.

Si bien la técnica de hipofisación continúa siendo la más utilizada, a partir de la década de 1970 se comenzó a ensayar con gonadotropinas de peces parcialmente purificadas y gonadotropina coriónica humana (hCG).

En la misma década se inició la utilización de GnRH, primero de mamíferos y luego de peces, en búsqueda de alternativas a la gonadotropina sintética. Estas hormonas de segunda generación operan en niveles más elevados del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal mediante el estímulo de la producción y/o liberación de gonadotropina en la hipófisis o también, en niveles más bajos del eje modulando la secreción de hormonas ováricas (Juárez-Palacios, 1989).

Estos inductores de la ovulación de segunda generación son moléculas pequeñas, evolutivamente conservadas, conocidas como análogos de GnRH (GnRH<sub>a</sub>), que pueden ser producidas sintéticamente resultando más económicas y eficientes en la inducción de maduración (Díaz y Neira, 2005) al ejercer su acción a diferentes niveles del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal (Juárez-Palacios, 1989). Además, la elección de GnRH para la inducción carece de efectos de especificidad de especie (Muñoz Cueto, 2009). También, el EBH posee gran variabilidad de contenido de LH de acuerdo al estado fisiológico y tamaño del pez donante. A la vez, se evitan la inyección de otras hormonas presentes en un EBH, que pueden ser

contraproducentes en la maduración final, y la posibilidad de transmisión de enfermedades de los donantes a los reproductores (Zohar y Mylonas, 2001).

A pesar de que *Gymnotus* sp. es un pez capaz de reproducirse en cautiverio (de Souza y de Andrade, 1984), las manipulaciones hormonales se pueden utilizar como herramienta de gestión en piscicultura para mejorar la eficiencia en la reproducción (Mylonas *et al.*, 2010). La obtención de información para la mejora de técnicas de manejo complementarias de la reproducción, junto con estudios de las necesidades nutricionales de los diferentes estadios de desarrollo y de las condiciones para su mantenimiento y crecimiento, es necesaria para su producción en cautiverio (Soares de Oliveira *et al.*, 2004). Además, los programas de reproducción en cautiverio posibilitan el aumento del conocimiento de la biología reproductiva de las especies cuyas poblaciones naturales se encuentran amenazadas por la presión de extracción (Bryan *et al.*, 2005).

**Tabla 1.1. Ejemplos de hipofisación en diferentes especies de peces.**

| Origen del EBH | Especies inducidas   | Sexo y dosis (mg kg <sup>-1</sup> ) | Autores                        |
|----------------|--|-------------------------------------|--------------------------------|
| Carpa común    | <i>Colossoma macropomum</i><br><i>Piaractus brachyomus</i> | M 2,5/H 0,5; 5                      | Woynarovich y Hórvath, 1980    |
|                | <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>                          | H 0,5; 5                            | Leonardo, 2003                 |
|                | <i>Prochilodus lineatus</i>                                | M 3                                 | Streit Jr <i>et al.</i> , 2004 |
|                | <i>Cyprinus carpio</i>                                     | M 3/H 0,5; 5                        | de Souza <i>et al.</i> , 2003  |
| Pollo          | <i>Leporinus macrocephalus</i>                             | M 5                                 | Streit Jr <i>et al.</i> , 2003 |
|                | <i>P. lineatus</i>   |                                     | Streit Jr <i>et al.</i> , 2004 |
|                | <i>C. carpio</i>   | M 5/H 1; 9                          | de Souza <i>et al.</i> , 2003  |
| Conejo         | <i>L. macrocephalus</i>                                    | M 7                                 | Streit Jr <i>et al.</i> , 2003 |
|                | <i>P. lineatus</i>   |                                     | Streit Jr <i>et al.</i> , 2004 |
|                | <i>C. carpio</i>   | M 7/H 1,4; 12,6                     | de Souza <i>et al.</i> , 2003  |

**EBH:** extracto bruto de hipófisis. **M:** machos. **H:** hembras. Dos dosis en hembras corresponden a aplicaciones preparatoria y desencadenante, respectivamente.

---

Con el estudio de las diferentes etapas de vida de la morena y de su ciclo reproductivo sería posible el desarrollo de la piscicultura con una especie que presenta en la actualidad una fuerte retracción de sus poblaciones naturales. La optimización de un protocolo para la obtención de reproducciones controladas contribuiría con el desarrollo de una piscicultura de ciclo completo, como tecnología aplicada a la cría de la morena, reduciendo los impactos de la pesca extractiva sobre este recurso.

## **OBJETIVO GENERAL**

---

- Contribuir al desarrollo de un paquete tecnológico para el cultivo de ciclo completo de *Gymnotus* sp.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

---

1. Evaluar la respuesta de *Gymnotus* sp. a la inducción de la reproducción con extracto bruto de hipófisis (EBH) y derivados sintéticos de hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) en condiciones de laboratorio.
2. Determinar el protocolo de inducción hormonal más adecuado para ~~la especie~~ el género.
3. Determinar los efectos del cautiverio en el éxito reproductivo.
4. Establecer los efectos de las condiciones de mantenimiento en cautiverio en el desarrollo gonadal de l género ~~la especie~~.
5. Elaborar una táctica alternativa que permita obtener grandes cantidades de alevinos para efectuar recría y engorde de manera masiva.

## **HIPÓTESIS**

---

- La reproducción de *Gymnotus* sp., en condiciones de laboratorio, es factible mediante la implementación de un protocolo de inducción hormonal adecuado.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS.

---

Las distintas experiencias de inducción de la reproducción, que a continuación se describen, fueron programadas en años consecutivos a partir de los resultados obtenidos en los ensayos previos.

Teniendo en cuenta que las experiencias de aclimatación de los reproductores con anterioridad a la época reproductiva durante los meses de otoño invierno realizadas en el Centro de Investigaciones en Piscicultura Experimental (CIPEX) de la FCV-UNR fueron infructuosas debido a las bajas temperaturas registradas en las instalaciones exteriores, se definió reducir al mínimo el tiempo entre la recepción de los ejemplares y el inicio de cada ensayo.

### 2.1. EXPERIENCIA 1. *Inducción con extracto bruto de hipófisis (EBH).*

El primer ensayo de inducción hormonal se realizó en diciembre de 2012, con animales adultos de peso medio (Pm)  $115,16 \pm 30,93$  g y longitud total media (LTm)  $316 \pm 23$  mm. Los reproductores inmediatamente después de su llegada a las instalaciones fueron distribuidos en 4 tanques de 1000 l cada uno, donde permanecieron una semana antes de la inducción hormonal. El agua se mantuvo alrededor de los  $23 \pm 1^\circ$  C. La alimentación diaria, efectuada con lombrices, fue interrumpida 24 horas antes de la inducción.

Los ejemplares fueron inyectados con EBH de carpa siguiendo la técnica descrita por Woynarovich y Hórvath (1980) en dosis fijas. Las hipófisis fueron maceradas en mortero con solución fisiológica estéril y el EBH fue administrado por vía intramuscular en posición dorsal, a nivel del primer tercio de la longitud total del ejemplar (Fig. 2.1). Se utilizó una dosis inicial de  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$  y una final de  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  de EBH, esta última administrada a las 8 horas de la dosis inicial en todos los ejemplares.

La experiencia se realizó con 38 ejemplares adultos de *Gymnotus* sp. distribuidos en tres grupos conformados al azar de la siguiente manera:

- a. **TEBH12**: este grupo incluyó 6 hembras y 9 machos que fueron estrujados 12 horas después de la dosis final;
- b. **TEBH20**: conformado por 4 hembras y 9 machos estrujados luego de 20 horas posteriores a la dosis final;

- c. **Control:** este grupo incluyó 5 hembras y 5 machos que fueron inyectados con 0,5 y 1 ml de solución fisiológica estéril siguiendo el método descrito en el segundo párrafo de esta sección y estrujados a las 20 horas posteriores a la última inyección.



**Figura 2.1. Localización del sitio de inyección para inducción hormonal.** Los puntos azules limitan el sector donde se colocaron las inyecciones.

Al cumplirse los tiempos detallados precedentemente, se procedió al estrujado de los ejemplares mediante masajes abdominales suaves sobre la pared celomática en sentido caudo-craneal, en la zona de proyección de las gónadas para la obtención de los gametos. Para ello, los reproductores fueron retirados de los tanques, de a uno por vez, y se secó la piel de cada animal en la zona circundante a la papila urogenital, antes de la maniobra.

Posteriormente, en cada ejemplar se procedió a la extracción de sangre por punción de la vena caudal mediante jeringas de 1 ml y agujas descartables. Luego, la sangre se colocó en tubos Eppendorf y se centrifugó a temperatura ambiente durante 3 minutos a 5000 rpm. Las muestras de suero fueron congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para luego medir el contenido de hormona luteinizante (LH) por método ELISA (LH AccuBind, Monobind Inc.).

Finalmente, tanto los ejemplares que pudieron ser estrujados exitosamente como los que no liberaron las gametas mediante el masaje abdominal fueron eutanasiados mediante inmersión en solución de benzocaína (200 ppm) y posterior sección medular. Se realizó la apertura de la cavidad celómica para corroborar o determinar el sexo. Luego se extrajeron y pesaron las gónadas para el cálculo del índice gonadosomático (IGS) y en los ejemplares que no liberaron los gametos mediante masajes abdominales se extrajeron los ovocitos o el semen y se registraron las siguientes variables:

En las hembras se determinó el porcentaje de ovocitos con vesícula germinal en posición periférica (%OVGPP) y el diámetro de ovocitos. El análisis de %OVGPP se realizó utilizando 25 ovocitos de cada hembra previamente fijados en líquido de Serra (60 ml de etanol 90%, 30 ml de formaldehído 35% y 10 ml de ácido acético glacial). El diámetro de los ovocitos ( $\mu\text{m}$ ) se calculó midiendo 10 ovocitos de cada hembra, a partir de una muestra previamente fijada en líquido de Gilson (5 ml de etanol 60%, 0,9 ml de ácido acético glacial, 0,7 ml de ácido nítrico 80%, 1 g de cloruro de mercurio y 44 ml de agua destilada). Ambos análisis fueron realizados utilizando microscopio óptico a 40x.

En los machos se registraron motilidad y concentración espermáticas. Para evaluar la motilidad espermática se activó el semen con agua destilada en proporción 1:4 (semen:agua) y fue estimada de acuerdo con la metodología aplicada por Felizardo *et al.* (2010). La concentración espermática (número de espermatozoides  $\text{ml}^{-1}$ ) fue evaluada en una solución compuesta por 10  $\mu\text{l}$  de semen y 990  $\mu\text{l}$  de solución de formol citrato (2,9 g de citrato de sodio, 4 ml de formaldehído 35% y 100 ml de agua destilada) en cámara de Neubauer y utilizando un microscopio óptico a 400x (Felizardo *et al.*, 2010).

El IGS se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{IGS} = \text{peso de la gónada} / \text{peso del ejemplar} \times 100 \text{ (Vazzoler, 1996).}$$

Para el cálculo del IGS en ejemplares estrujados al peso de la gónada se le sumó el peso de la desova.

## **2.2. EXPERIENCIA 2. Inducción con GnRH sintética.**

Para este ensayo se utilizaron 15 ejemplares adultos de *Gymnotus* sp. ( $40,20 \pm 5,01$  g de Pm y  $244,13 \pm 8,88$  mm de LTm) que ingresaron a las instalaciones del CIPEX con 4 meses de antelación al inicio de la experiencia que se desarrolló a fin del mes de enero de 2014. Al momento de ser alojados en las instalaciones de cuarentena, los ejemplares fueron sexados mediante ecografía con un equipo Sonoscape A5V con transductor microconvexo de frecuencia variable de 6,5 MHz para conformar las parejas de reproductores de tamaños similares (Rotta *et al.*, 2007).

Se utilizaron 4 tanques en el laboratorio de 300 l de capacidad, con recambio parcial de agua después de la oferta de alimento, donde fueron alojadas 2 parejas por tanque, a excepción

de uno en el que se mantuvieron 2 hembras y un macho. Los ejemplares fueron alimentados con 1 a 3 lombrices cada 2 días, de acuerdo al consumo observado. La temperatura durante la inducción fue de 23°C.

Para la inducción se utilizó una solución de GnRH sintética (GnRH, Río de Janeiro) conteniendo 4,2 µg de acetato de buserelina ml<sup>-1</sup>, administrada por vía intramuscular en dosis fijas. Se realizó la extrusión de gametas a distintos tiempos post-inducción. En hembras se empleó una dosis inicial de GnRH sintética de 0,25 ml kg<sup>-1</sup> y una final de 0,75 ml kg<sup>-1</sup> (Sampaio Paulino *et al.*, 2011), esta última administrada a las 12 horas de la dosis inicial. En los machos, se realizó una aplicación única con 0,5 ml kg<sup>-1</sup>. Los 15 reproductores se distribuyeron en 3 grupos:

- a. **TGnRH10**: en este grupo se incluyeron 2 hembras y 2 machos que fueron estrujados 10 horas después de la dosis final;
- b. **TGnRH12**: conformado por 4 hembras y 3 machos estrujados luego de 12 horas posteriores a la dosis final;
- c. **Control**: en este grupo se incluyeron 2 hembras y 2 machos que fueron inyectados con 0,5 y 1 ml de solución fisiológica estéril siguiendo el método descripto precedentemente.

### **2.3. EXPERIENCIA 3. Inducción con EBH y GnRH sintética y manejo de variables ambientales.**

Teniendo en cuenta los resultados de las experiencias previas, durante la temporada 2014-2015 se realizó un ensayo de inducción con reproductores de *Gymnotus* adquiridos en Casilda, provenientes de Formosa. Los ejemplares registraron  $26,83 \pm 7,41$  g de Pm y  $208,67 \pm 17,53$  mm de LTm y fueron sexados utilizando un equipo para ecografía Sonoscape A5V con transductor microconvexo de frecuencia variable de 6,5 MHz (Rotta *et al.*, 2007). Posteriormente, se conformaron 12 parejas con ejemplares de tamaños similares entre sí, disponiendo las mismas en tanques de fibra de vidrio de 300 l provistos con flecos de nylon que simulaban plantas artificiales, en el laboratorio de reproducción del CIPEX.

Los animales se mantuvieron durante un período de 2 meses de adaptación en las condiciones previamente descritas combinando con un fotoperiodo controlado (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad), como factor proximal predictivo, y el agregado de agua destilada a los tanques para disminuir la conductividad de la misma, como factor proximal sincronizador (Vazzoler, 1996). En cada tanque se agregaron 2 litros de agua destilada semanalmente. Durante los últimos 16 días antes de la inducción hormonal, el agregado de 1,5 litros de agua destilada a cada tanque se efectuó diariamente, registrándose los valores de conductividad con un equipo multiparamétrico HANNA 9813-6 antes de la reproducción artificial.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las experiencias 1 y 2, los ejemplares fueron inyectados utilizando los protocolos de inducción hormonal para EBH y GnRH descriptos en la Tabla 2.1.

Cada grupo de tratamiento fue conformado de la siguiente manera:

- a. **TEBH12**: 4 parejas en 2 tanques diferentes;
- b. **TGnRH12-1**: 3 parejas, 2 en un tanque y la restante en otro;
- c. **TGnRH12-2**: 3 parejas, distribuidas igual que el tratamiento anterior;
- d. **Control**: 2 parejas en un mismo tanque.

**Tabla 2.1. Esquemas de inducción hormonal de la experiencia 3.**

| Grupo            | Dosis  |
|------------------|--|
| <b>TEBH12</b>    | 1°D: 0,1 ml kg <sup>-1</sup><br>2°D: 1 ml kg <sup>-1</sup>     |
| <b>TGnRH12-1</b> | 1°D: 0,25 ml kg <sup>-1</sup><br>2°D: 0,75 ml kg <sup>-1</sup> |
| <b>TGnRH12-2</b> | 1°D: 0,25 ml kg <sup>-1</sup><br>2°D: 1 ml kg <sup>-1</sup>    |
| <b>Control</b>   | 1°D: 0,2 ml kg <sup>-1</sup><br>2°D: 1 ml kg <sup>-1</sup>     |

**D** (dosis): Cada ml de EBH contiene 5 mg de hipófisis completas maceradas en solución fisiológica. Cada ml de GnRH contiene 4,2 µg de acetato de buserelina. Los reproductores del grupo control fueron inyectados con solución fisiológica.

Los ejemplares fueron sometidos a tratamiento el mismo día, secuencialmente, para estrujar la totalidad de los ejemplares de cada grupo transcurridas 12 horas desde la dosis final.

#### **2.4. EXPERIENCIA 4. Inducción hormonal en condiciones semi-naturales.**

Para la temporada 2015-2016, se planificó la aclimatación de nuevos reproductores en condiciones semi-naturales antes de la aplicación de los tratamientos hormonales. Este ensayo fue diseñado para evaluar los esquemas de inducción con EBH y GnRH en las dosis indicadas en la Tabla 2.1 pero en ejemplares mantenidos en condiciones similares al medio natural. A estos esquemas se agregarían uno con dosis más elevadas de EBH (1° Dosis: 1 mg kg<sup>-1</sup> y 2° Dosis 6 mg kg<sup>-1</sup>) más un grupo control adicional sin inyectar.

Se prepararon 6 tanques diseñados para la cría de yacarés, de fibra de vidrio de 2,5 x 3,0 m y 0,25 a 0,75 m de profundidad para separar diferentes lotes de reproductores. Los tanques fueron instalados bajo sombra parcial de árboles, con fotoperiodo natural, en un campo en la localidad de Santa Ana de los Guácaras (Corrientes). Se utilizó agua corriente para el llenado de las piletas y luego de transcurridas 24 horas fueron fertilizadas con estiércol vacuno a razón de 300 kg ha<sup>-1</sup> y sembradas con camalotes (*Eichhornia crassipes*) y helechos de agua (*Salvinia auriculata*) (Fig. 2.2).

Los ejemplares, provenientes de una captura realizada a finales de octubre de 2015, fueron sexados mediante ecografía (Rotta *et al.*, 2007) con un equipo Berger LC2010 dotado de transductor plano de frecuencia variable de 5,5 MHz, corroborando por comparación del tamaño relativo de la cloaca con respecto al orificio genital (Ushizima & Bock, 2000) (Ushizima & Bock, 2000) (Ushizima & Bock, 2000), y sembrados en los estanques.

Fueron utilizados un total de 60 animales adultos con 27,80 ± 6,27 g de Pm y 208,92 ± 13,11 mm de LTm, distribuidos al azar en grupos de 10, 5 hembras y 5 machos por estanque, para cada tratamiento hormonal planificado y los respectivos controles.

La alimentación fue provista naturalmente por la productividad del estanque con el agregado de un aporte diario del 3% del peso vivo de alimento balanceado con 41% de proteína bruta durante 15 días, al comienzo de la experiencia. No se pudo constatar el consumo de balanceado y se reemplazó con el agregado de larvas de mosquitos 3 días a la semana.



**Figura 2.2. Unidades de cultivo en condiciones seminaturales utilizadas en la experiencia 4.**

El comienzo de la temporada de precipitaciones del verano se utilizó para generar un cambio abrupto de la conductividad del agua, factor climático sincronizador que actúa como gatillo sobre el eje Hipotálamo-Hipofisario-Gonadal para el desarrollo total de las gónadas en *Gymnotus* (Kirschbaum y Wieczorek, 2002). Se registraron los valores de conductividad del agua en los estanques al inicio del ensayo y al momento de la recolección de reproductores para la inducción con un equipo Hanna, HI99300.

Transcurridos 102 días de aclimatación en los estanques, luego se procedió a la extracción de los reproductores encontrándose una cantidad reducida de ejemplares con respecto a los sembrados. En base a la reducción del número de reproductores totales disponibles para el ensayo ( $n=23$ ) y los resultados previos obtenidos en experiencias anteriores para cada tratamiento, se decidió dividir los ejemplares en los siguientes grupos:

- a. **TEBH12:** este grupo incluyó 17 ejemplares provenientes de los estanques 1, 2, 3, 4 y 5 que recibieron dos dosis de EBH separadas entre sí 8 horas (1° Dosis:

0,5 mg kg<sup>-1</sup> y 2<sup>o</sup> Dosis 5 mg kg<sup>-1</sup>) y que fueron estrujados 12 horas después de la dosis final;

- b. **Control:** este grupo incluyó seis reproductores del estanque 6 que fueron inyectados con 0,5 y 1 ml de solución fisiológica estéril, y estrujados a las 12 horas posteriores a la última inyección.

## 2.5. EXPERIENCIA 5. *Evaluación de los efectos de las condiciones de cultivo en el desarrollo gonadal.*

Los efectos del estrés post-captura en el desarrollo de las gónadas se analizaron en un total de 98 animales adultos, 58 hembras y 40 machos, con Pm de  $26,84 \pm 9,13$  g y LTm de  $206,67 \pm 29,64$  mm. Los ejemplares, provenientes de captura fueron sexados inmediatamente por estudio ecográfico con un equipo Berger LC2010 con transductor plano de frecuencia variable de 6 MHz, corroborando por comparación del tamaño relativo de la cloaca con respecto al orificio genital (Rotta *et al.*, 2007).

Luego de la selección por sexo, al día siguiente se realizó la separación de los grupos quedando conformados de la siguiente manera:

- a. **Control:** conformado por 7 hembras y 4 machos que fueron eutanasiados y muestreados al inicio de la experiencia (día 0), siendo utilizados como grupo control inicial;
- b. **GL:** en este grupo experimental se utilizaron 30 hembras y 21 machos en 3 piletas de lona de 2,5 x 3,0 m y 0,5 m de profundidad (10 hembras y 7 machos por pileta) en condiciones de laboratorio, armadas bajo cubierta, con caños de PVC de diferente tamaño y diámetro dentro del agua para refugio de los animales. Se agregaron plantas acuáticas flotantes después de registrarse una elevada mortandad de animales durante los primeros días;
- c. **GE:** en este grupo fueron sembradas 21 hembras y 15 machos en 3 estanques exteriores de fibra de vidrio (7 hembras y 5 machos por pileta) de similar tamaño que las de GL, instalados al aire libre en un sector del Instituto de Ictiología del Nordeste (Corrientes) bajo sombra parcial de malla plástica (mediasombra

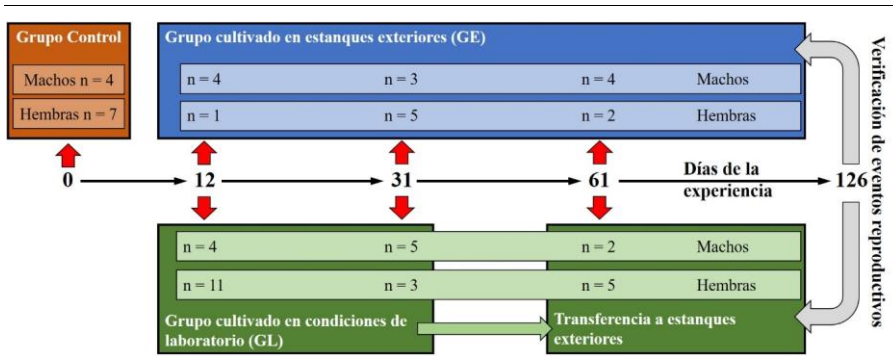
80%). Se introdujeron caños de PVC de diferente tamaño y diámetro dentro del agua para proveer refugio a los animales y también camalotes (*Eichhornia crassipes*) y helechos de agua (*Salvinia auriculata*) el día 0 de la experiencia.

Se utilizó agua de perforación para el llenado de las piletas y se fertilizó con estiércol vacuno a razón de 300 kg ha<sup>-1</sup>. La alimentación se realizó diariamente con postas de pescado. La disminución de la conductividad del agua contenida en los estanques de reproductores ocurrió en GE de manera natural por efecto de las precipitaciones, mientras que la misma se mantuvo constante en GL.

A los 12 y a los 31 días de la transferencia a los recintos de cada grupo se extrajeron hembras y machos elegidos al azar dentro de cada grupo experimental (Fig. 2.3) para evaluar las variaciones inducidas por las condiciones de confinamiento en los órganos muestreados según el procedimiento descrito más abajo.

Luego del segundo muestreo del GL, los animales restantes fueron trasladados a estanques exteriores en condiciones similares a GE. A los 30 días del traslado se tomaron nuevamente muestras de los órganos indicados en hembras y machos de ambos grupos (Fig. 2.3). Posteriormente, transcurridos 126 días desde el inicio de la experiencia, se controló la ocurrencia de reproducción dentro de los estanques pescando mediante red de marco en cada unidad de cultivo correspondiente a los diferentes grupos experimentales. Los estanques fueron cosechados en su totalidad a los 140 días desde el comienzo de la experiencia y los alevinos/juveniles recolectados fueron medidos y pesados.

En los momentos y grupos indicados en la Fig. 2.3., se procedió a la eutanasia de los ejemplares mediante inmersión en solución de benzocaína (200 ppm) y posterior sección medular. Luego, se pesó cada ejemplar y se abrió la cavidad celómica, extrayendo las gónadas. Luego, los ovarios y testículos se pesaron para el cálculo del IGS. Todos los órganos extraídos se fijaron en líquido de Bouin durante 16 horas y luego fueron transferidos a etanol al 70% hasta su procesamiento de manera rutinaria para inclusión de las muestras en parafina. Posteriormente, en los bloques se realizaron cortes de 3 µm de espesor y las secciones fueron teñidas con hematoxilina y eosina para su evaluación con un microscopio Leica DM750 con una cámara digital Leica EC3. En el caso de los ovarios, se tomaron además alícuotas de aproximadamente 100 mg que se fijaron en líquido de Serra por separado para realizar el conteo de ovocitos en cada hembra.



**Figura 2.3. Esquema de muestros de la experiencia 5.** Las flechas rojas indican los días en los que se realizaron los muestros en los distintos grupos.

En las hembras se determinó:

- Diámetro de ovocitos ( $\mu\text{m}$ ). Esta variable se registró con lupa estereoscópica a partir de las muestras fijadas en líquido de Serra.
- Fecundidad Absoluta = número de ovocitos de la muestra x (peso del ovario / peso de la muestra) (Escobar *et al.*, 2016).
- IGS = peso del ovario / peso del ejemplar x 100.
- Frecuencia relativa de distintos estadios de desarrollo de ovocitos. En cada ejemplar, se contaron al microscopio los ovocitos que aparecían a 100X en 5 campos al azar y se clasificaron en las categorías de desarrollo descritas para la especie (Ishiba *et al.*, 2009), estableciendo también la frecuencia relativa de las distintas fases de desarrollo.

Por su parte, en los machos se determinó:

- IGS = peso del testículo / peso del ejemplar x 100.
- Frecuencia relativa de distintos estadios de desarrollo gonadal. Para cada ejemplar, se contaron los túbulos seminíferos con diferentes fases de desarrollo del epitelio germinativo que aparecían al microscopio en 5 campos al azar con aumento de 100X y se clasificaron en las categorías de desarrollo descritas para la especie

(Ishiba *et al.*, 2009), estableciendo también la frecuencia relativa de las distintas fases de desarrollo.

Todas las mediciones se realizaron sobre imágenes digitalizadas con el software de análisis de imágenes Image J (v. 1.51j8).

## **2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

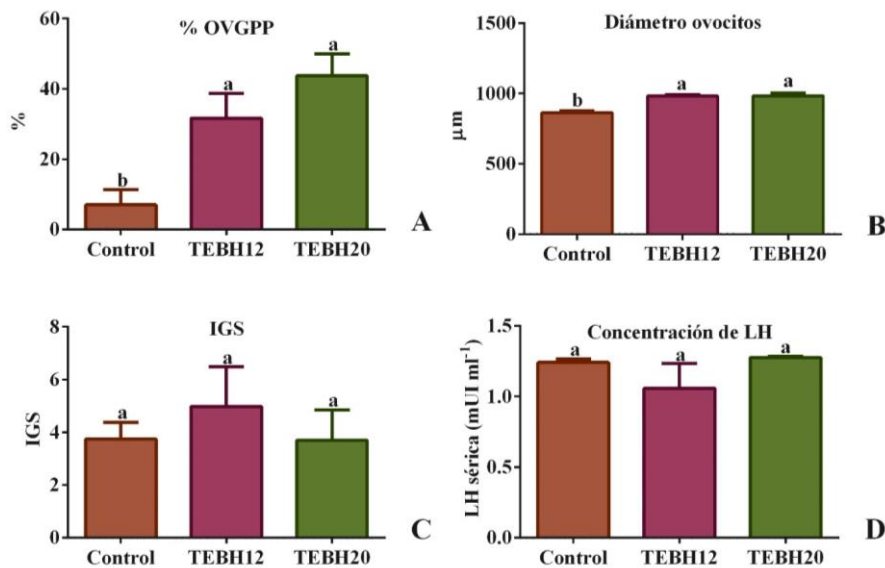
Los datos se analizaron mediante t de student o ANOVA a un criterio de clasificación con test de comparación de Tukey, según corresponda a las variables evaluadas en cada ensayo, utilizando el programa JMP (v. 5.1.2.) y considerando diferencias estadísticamente significativas a  $p \leq 0,05$ . Cuando las variables no presentaron una distribución normal se utilizó test de Kruskal-Wallis o test de Mann-Whitney.

### 3. RESULTADOS.

#### 3.1. EXPERIENCIA 1. Inducción con extracto bruto de hipófisis (EBH).

La inducción hormonal realizada de acuerdo al esquema descrito en el apartado 2.1. sólo permitió obtener ovocitos por extrusión en dos ejemplares del grupo TEBH12, mientras que en las hembras restantes las gametas se obtuvieron luego de la eutanasia de los ejemplares. El %OVGPP fue significativamente superior ( $p = 0,0053$ ) en las hembras de los grupos tratados con EBH respecto a las hembras del grupo control (Fig. 3.1.A.).

De la misma manera, el diámetro de los ovocitos en las hembras de TEBH12 Y TEBH20 presentó valores medios de 981,5  $\mu\text{m}$  y 983,5  $\mu\text{m}$ , respectivamente, ambos significativamente superiores ( $p < 0.0001$ ) en comparación con el valor medio de 864,3  $\mu\text{m}$  observado en los ejemplares del grupo control (Fig. 3.1.B.).

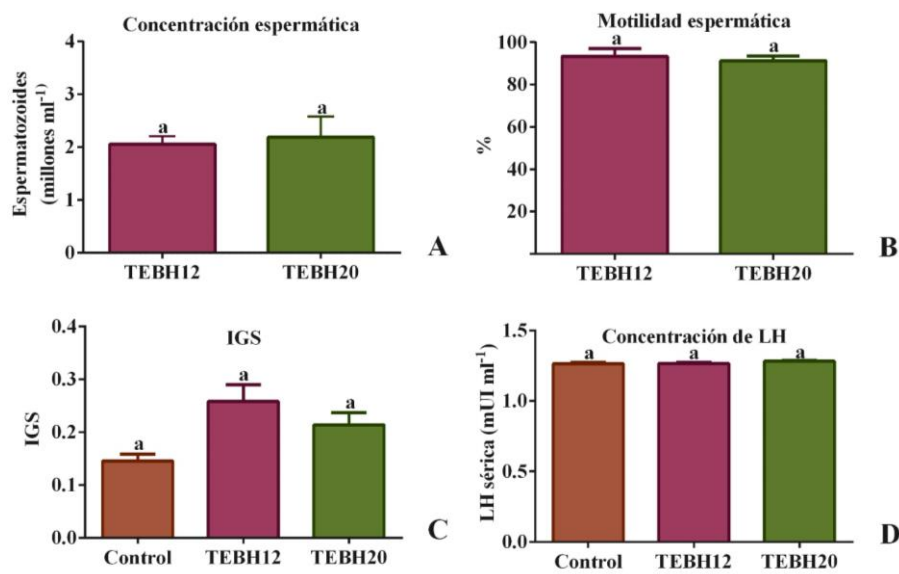


**Figura 3.1. Valores medios ( $\pm$ SEM) de las variables analizadas en hembras inducidas con EBH. A. Porcentaje de ovocitos con vesícula germinal en posición periférica (%OVGPP). B. Diámetro de ovocitos. C. Índice gonadosomático (IGS). D. Concentración de LH. Letras distintas entre grupos indican diferencias estadísticamente significativas.**

En los valores de IGS, si bien no se observaron diferencias significativas entre grupos (Fig. 3.1.C), el promedio de las hembras del grupo TEBH12 fue ligeramente superior a los restantes grupos.

Los niveles séricos de LH tampoco mostraron diferencias significativas entre las hembras de los distintos grupos (Fig. 3.1.D), aunque el valor medio registrado en TEBH12 fue menor.

Por otra parte, todos los machos inducidos con EBH liberaron gametas al ser estrujados, aunque el volumen seminal extraído fue reducido, con un rango de 100 a 800  $\mu\text{l}$ . En los machos del grupo control no se obtuvo semen por extrusión por lo que no pudieron cuantificarse las variables de calidad seminal analizadas.



**Figura 3.2. Valores medios ( $\pm$ SEM) de las variables analizadas en machos inducidos con EBH. A. Concentración espermática. B. Motilidad espermática. C. Índice gonadosomático (IGS). D. Concentración de LH. Letras distintas entre grupos indican diferencias estadísticamente significativas.**

La concentración espermática no presentó diferencias significativas entre los machos de TEBH12 ( $2,06 \pm 0,15 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$ ) y TEBH20 ( $2,19 \pm 0,39 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$ ), si bien se observaron valores mayores en este último grupo (Fig. 3.2.A). Las medias de motilidad espermática fueron mayores al 90% para ambos tratamientos, aunque sin diferencias estadísticas significativas entre grupos (Fig. 3.2.B).

Finalmente, al igual que en las hembras, no se observaron diferencias significativas en el IGS (Fig. 3.2.C) ni en los niveles séricos de LH en machos (Fig. 3.2.D) entre grupos control y tratados.

Cuando se compararon los niveles de LH entre machos y hembras de un mismo grupo de tratamiento tampoco se encontraron diferencias significativas entre ellos.

### 3.2. EXPERIENCIA 2. Inducción con GnRH sintética.

En ninguno de los grupos se obtuvieron resultados positivos al ser inyectados con GnRH sintética siguiendo los protocolos descritos anteriormente en el apartado 2.2. en Materiales y Métodos.

### 3.3. EXPERIENCIA 3. Inducción con EBH y GnRH sintética y manejo de variables ambientales.

Si bien el agregado de agua destilada a los tanques previo a la inducción hormonal redujo la conductividad (Tabla 3.1.), esta reducción no fue suficiente para un cambio abrupto de este parámetro sincronizador.

**Tabla 3.1. Variaciones de la conductividad del agua ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) en los tanques entre el inicio de la experiencia 3 y el momento de la inducción hormonal.**

|   | Tanques |     |     |     |
|---|---------|-----|-----|-----|
| Evento (Fecha)                          | 1-2     | 3-4 | 5-6 | 7   |
| Siembra de reproductores (22/12/14)     | 103     | 107 | 105 | 103 |
| Recolección de reproductores (20/02/15) | 78      | 78  | 78  | 79  |

Tanques 1-2: TEBH12, tanques 3-4: TGnRH12-1;  
tanques 5-6: TGnRH12-2; tanque 7: control

De igual manera, se continuó la experiencia de acuerdo con lo planificado utilizando los protocolos de inducción del apartado 2.3. en Materiales y Métodos. Ninguna de las dos hormonas utilizadas indujo resultados positivos durante las 24 horas posteriores a las dosis desencadenantes.

### 3.4. EXPERIENCIA 4. *Inducción en condiciones semi-naturales.*

Antes de extraer los reproductores para la inducción artificial y luego de que se produjeran precipitaciones por 366,5 y 227,4 mm durante los meses de diciembre de 2015 y enero de 2016, respectivamente, se registró la conductividad observándose una drástica reducción del parámetro en comparación con los valores determinados al inicio de la experiencia en todos los estanques (Tabla 3.2).

**Tabla 3.2. Variaciones de la conductividad del agua ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) en los estanques entre el inicio de la experiencia 4 y el momento de la inducción hormonal.**

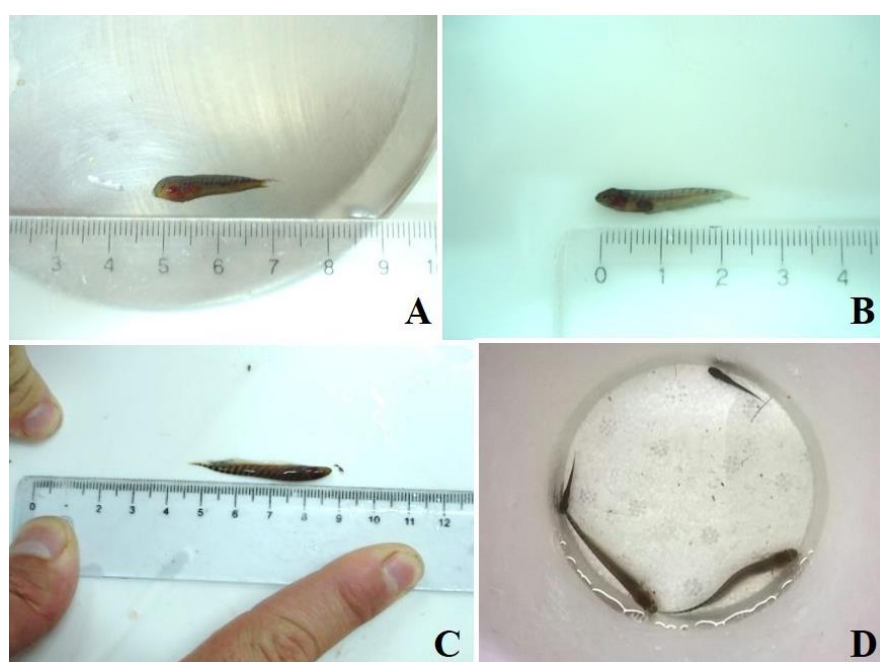
| Evento (Fecha) \ Estanque               | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Siembra de reproductores (23/10/15)     | 162 | 168 | 166 | 180 | 177 | 181 |
| Recolección de reproductores (02/02/16) | 18  | 23  | 28  | 19  | 20  | 22  |

Cuando se extrajeron los reproductores para la inducción hormonal, se constató una reducción del número de ejemplares originalmente sembrados. Además, se verificó la ocurrencia de al menos un evento reproductivo en cinco de los seis estanques, donde se rescataron juveniles de diferentes tamaños (Tabla 3.3).

**Tabla 3.3. Stock de reproductores y captura de juveniles.**

| Evento (Fecha) \ Estanque               | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  |
|---|----|----|----|----|----|----|
| Siembra de reproductores (23/10/15)     | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Recolección de reproductores (02/02/16) | 3  | 4  | 3  | 5  | 2  | 6  |
| Recolección de juveniles (02/02/16)     | SÍ | SÍ | SÍ | SÍ | NO | SÍ |
| Recolección de juveniles (06/03/16)     | SÍ | SÍ | SÍ | SÍ | SÍ | -  |

Los juveniles recolectados, 86 en total, presentaron tallas superiores a 21 mm. Todos presentaron las bandas negras en el tegumento, características de la especie, restringidas a la parte superior del cuerpo, pero de coloración tenue. Los de mayor tamaño, hasta 45 mm, presentaron bandas de coloración más intensa, pero manteniéndose limitadas a la musculatura del cuerpo sin alcanzar la aleta ventral (Fig. 3.3.A, 3.3.B y 3.3.C).



**Figura 3.3. Juveniles recolectados en los estanques junto con la recuperación de reproductores.** Nótese el bandeo característico de la especie a partir de los 20 mm de LT.

Por otra parte, los reproductores fueron trasladados en bateas al laboratorio para inducir la reproducción artificialmente. Luego de la segunda inyección de EBH en los ejemplares provenientes de los estanques 1 al 5, no se observaron comportamientos relacionados con la desova durante las 12 horas subsiguientes. Después de este período de tiempo, se realizaron masajes abdominales para obtener gametos sin resultados positivos en los reproductores

tratados con EBH ni en los inyectados con solución fisiológica. Los ejemplares se mantuvieron en el laboratorio hasta el día siguiente para comprobar si se producían puestas y fecundación, sin recuperarse huevos de ninguna batea.

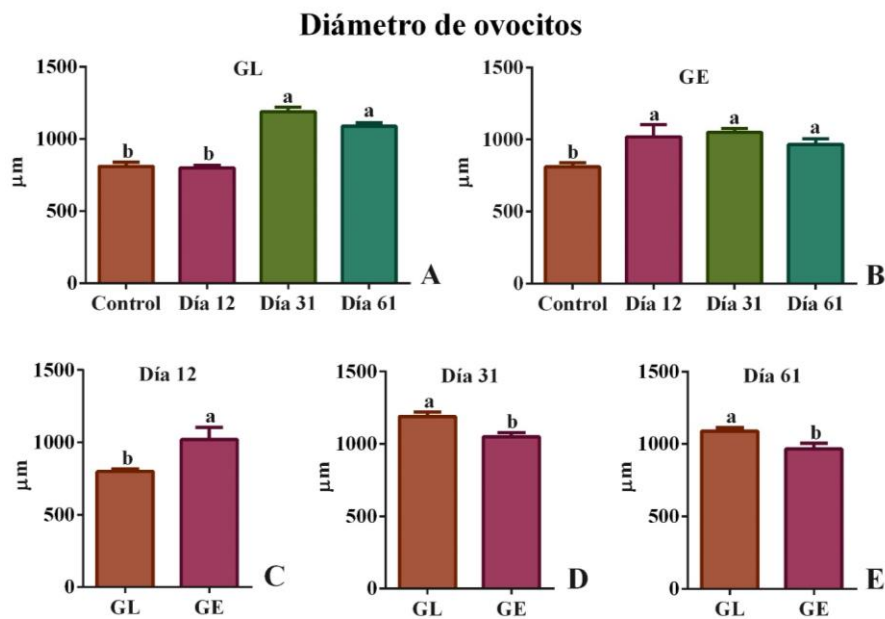
Posteriormente, los reproductores se devolvieron a los estanques correspondientes, excepto los del 5 y 6. Los dos ejemplares del estanque número 5 se distribuyeron en los estanques 1 y 3. Los reproductores del estanque 6 se colocaron en el estanque 5.

Transcurridos 30 días desde la inducción hormonal, se realizó una segunda recuperación de juveniles con resultado positivo para todos los estanques, incluido aquél en el que se encontraban los ejemplares inyectados con solución fisiológica (Tabla 3.3). Los juveniles recolectados midieron entre 12 y 75 mm, presentaron diferentes características de coloración y dentro de cada estanque también tenían diferentes edades (Fig. 3.3.D). Los menores eran de color marrón homogéneo sin bandas, mientras que los juveniles de mayor tamaño (n=59) midieron entre 22 y 75 mm.

### **3.5. EXPERIENCIA 5. *Evaluación de los efectos de las condiciones de cultivo en el desarrollo gonadal.***

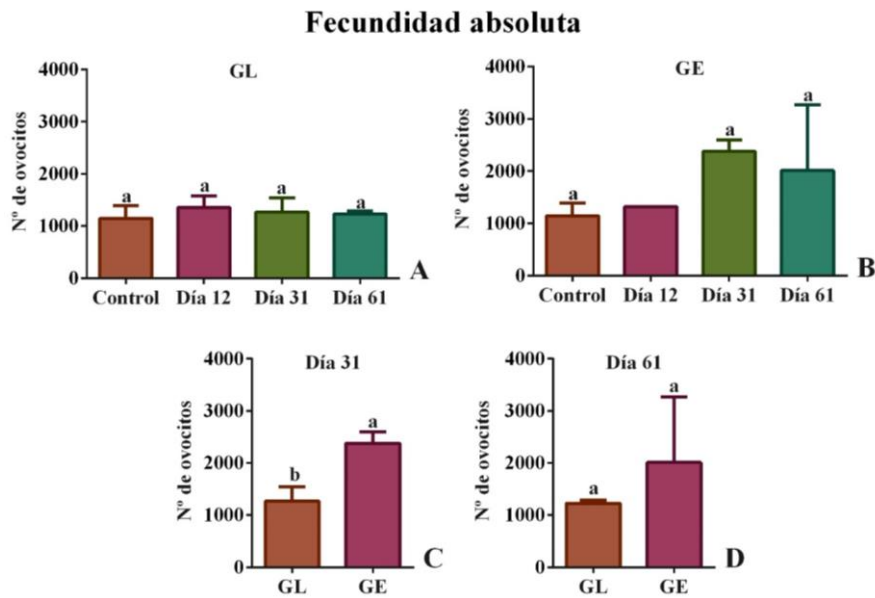
En el GL, el diámetro de los ovocitos se incrementó a partir de los 31 días de ensayo mostrando diferencias estadísticamente significativas respecto de los días 0 (control) y 12 de la experiencia (Fig. 3.4.A). Por otra parte, en las hembras del GE esta variable se diferenció estadísticamente del control más tempranamente desde los 12 días de ensayo (Fig. 3.4.B).

Cuando se comparó el diámetro de ovocitos entre tratamientos para una misma fecha de muestreo, se observó que a los 12 días las hembras del GE presentaron valores significativamente superiores respecto de GL (Fig. 3.4.C). Por el contrario, las hembras del GL mostraron ovocitos significativamente más grandes que las de GE a los 31 (Fig. 3.4.D) y 61 (Fig. 3.4.E) días de ensayo.



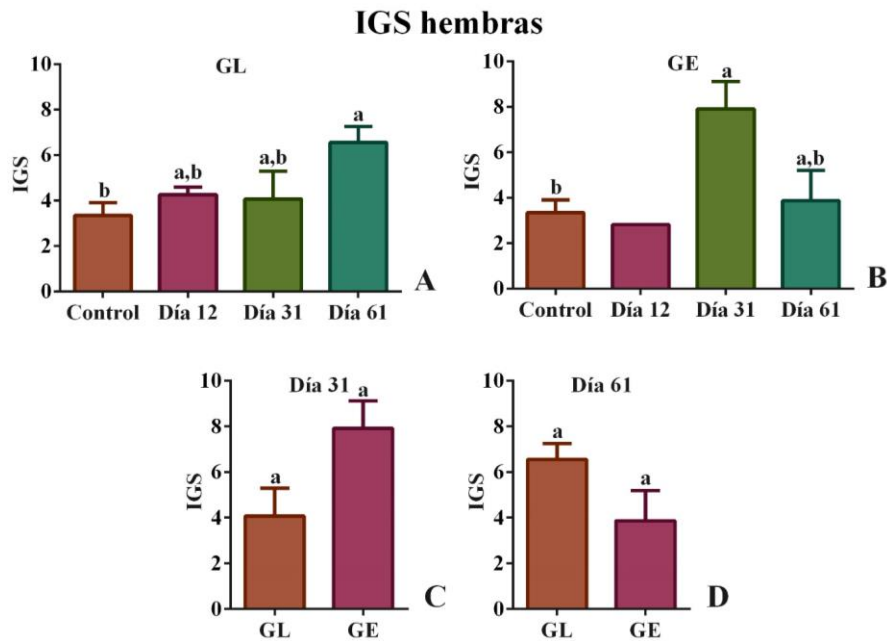
**Figura 3.4. Valores medios ( $\pm$ SEM) del diámetro de ovocitos por grupo de tratamiento (A, B) y días de muestreo (C, D, E). Letras distintas entre grupos o días de muestreo indican diferencias estadísticamente significativas.**

La fecundidad absoluta no mostró diferencias estadísticamente significativas a lo largo del ensayo dentro de cada grupo experimental (Fig. 3.5.A y 3.5.B). Cuando se comparó esta variable entre grupos para un mismo día de muestreo, las hembras del GE presentaron una fecundidad absoluta significativamente superior a las del GL a los 31 días de ensayo (Fig. 3.5.C), aunque no se diferenciaron estadísticamente en el último muestreo (Fig. 3.5.D).



**Figura 3.5. Valores medios ( $\pm$ SEM) de la fecundidad absoluta por grupo de tratamiento (A, B) y días de muestreo (C, D). Letras distintas entre grupos o días de muestreo indican diferencias estadísticamente significativas. En la figura B no se indica letra para el día 12 ya que el dato corresponde a una única hembra y por tanto no fue tomada en cuenta para el análisis estadístico.**

Por su parte, el IGS de las hembras de ambos grupos mostró diferencias significativas a lo largo de la experiencia. En GL, esta variable fue significativamente superior a los 61 días del inicio del ensayo respecto al grupo control (Fig. 3.6.A), es decir, el IGS sólo se incrementó significativamente luego de que los ejemplares fueron trasladados a los estanques exteriores. En GE las diferencias se observaron más tempranamente ya que el IGS fue significativamente superior a los 31 días respecto del inicio de la experiencia, luego de lo cual, se denotó una disminución marcada de los valores de la variable (Fig. 3.6.B).

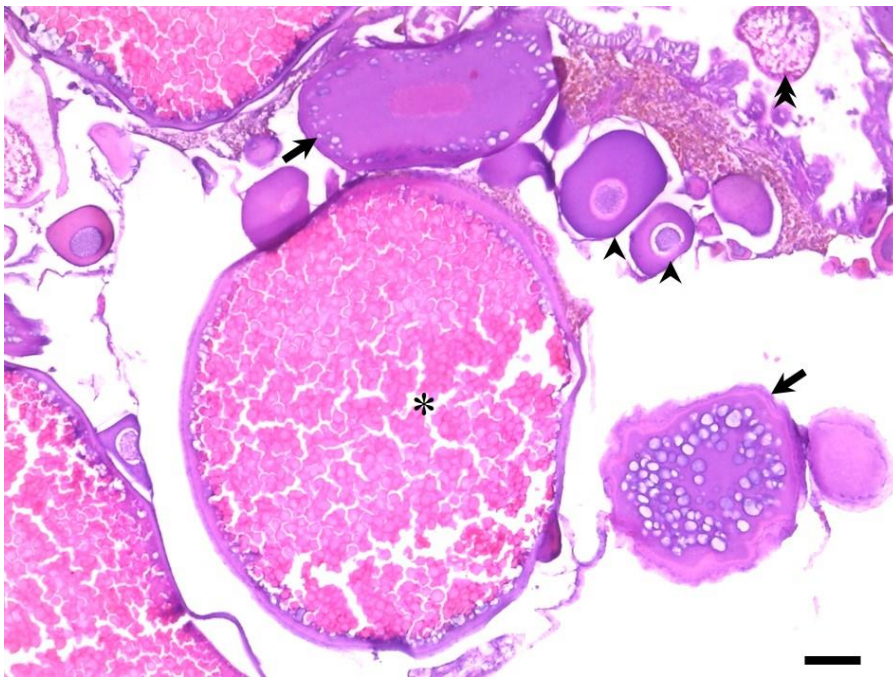


**Figura 3.6. Valores medios ( $\pm$ SEM) del IGS en hembras por grupo de tratamiento (A, B) y días de muestreo (C, D). Letras distintas entre grupos o días de muestreo indican diferencias estadísticamente significativas. En la figura B no se indica letra para el día 12 ya que el dato corresponde a una única hembra y por tanto no fue tomada en cuenta para el análisis estadístico.**

Cuando se compararon los valores medios del IGS de hembras entre grupos a una misma fecha de muestreo, si bien no se registraron diferencias estadísticamente significativas, los ejemplares del GE mostraron mayores valores que los del GL los primeros 31 días de la experiencia (Figuras 3.6.C). Por el contrario, a los 61 días se observaron valores de IGS inferiores en el GE respecto de GL, aunque sin diferencias significativas (Fig. 3.6.D).

Respecto de los estadios ovocitarios, pudieron identificarse todos los descritos para la especie. Las ovogonias se caracterizaron por ser células redondeadas con núcleo grande que ocupó gran parte del volumen celular, con cromatina laxa y nucléolo evidente. Los ovocitos previtelogénicos iniciales se identificaron como células más grandes con abundante citoplasma

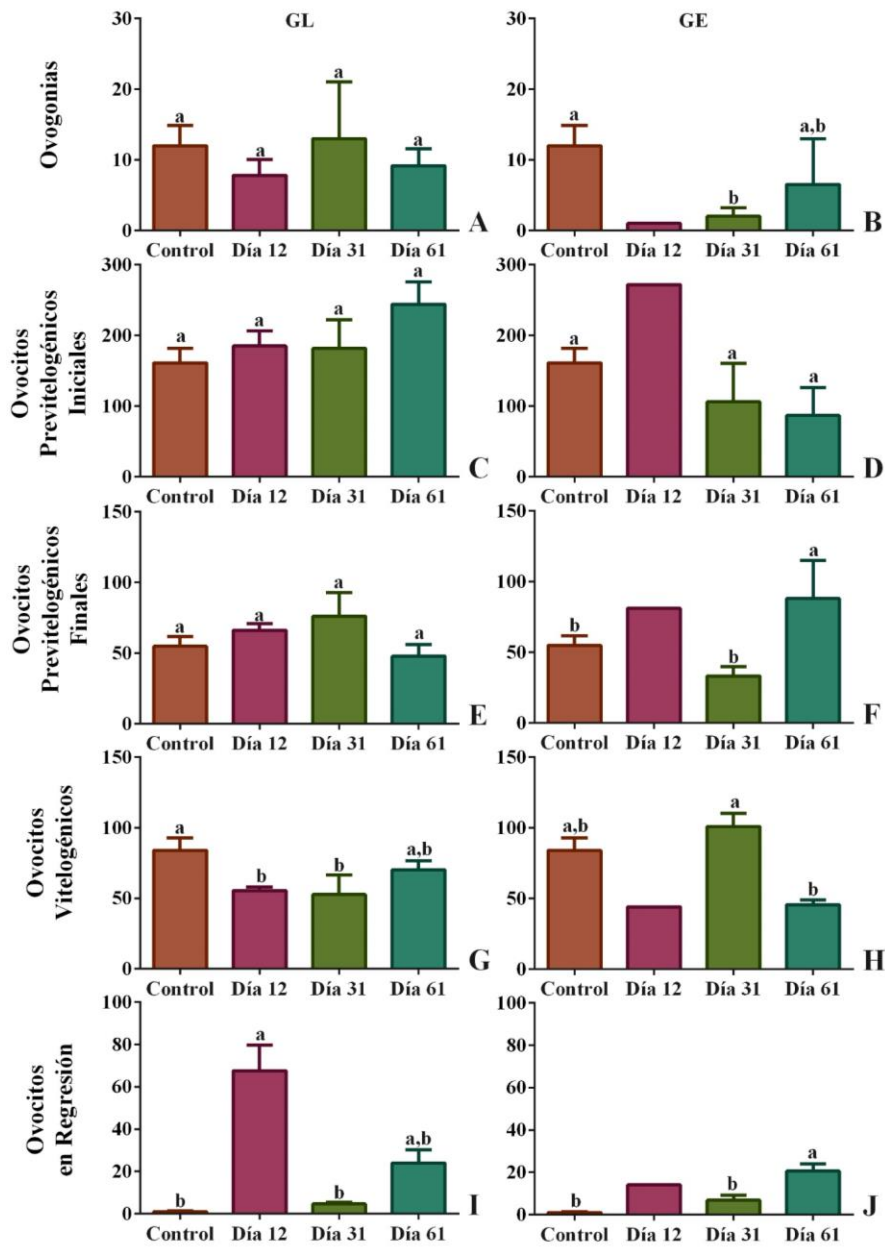
homogéneo y basófilo y un núcleo de cromatina laxa con numerosos nucléolos periféricos. Los ovocitos previtelogénicos finales mostraron un tamaño aún mayor y se caracterizaron por la aparición de los alveolos corticales. Los ovocitos vitelogénicos fueron fácilmente reconocidos por ser las células de mayor tamaño y con el citoplasma completamente ocupado por gránulos de vitelo. Los ovocitos en regresión presentaron una forma irregular, con aspecto desorganizado y reabsorción de los gránulos de vitelo (Fig. 3.7).



**Figura 3.7. Estadios de desarrollo de ovocitos en *Gymnotus* sp.** Ovocitos previtelogénicos iniciales (cabezas de flecha), ovocitos previtelogénicos finales (flechas), ovocito vitelogénico (asterisco) y ovocito en regresión (doble cabeza de flecha). Barra = 200  $\mu$ m.

No se observaron diferencias significativas a lo largo de la experiencia en el número de ovogonias y ovocitos previtelogénicos iniciales y finales en las hembras confinadas en condiciones de laboratorio (Fig. 3.8.A, 3.8.C, 3.8.E), ni en los ovocitos previtelogénicos iniciales en los ejemplares alojados en condiciones semi-naturales (Fig. 3.8.D). En este último

### Número de ovogonias/ovocitos en distintos estadios de desarrollo



**Figura 3.8. Valores medios ( $\pm$ SEM) del número de ovogonias/ovocitos en distintos estadios de desarrollo por grupo de tratamiento.** Letras distintas entre días de muestreo indican diferencias estadísticamente significativas. En las figuras B, D, F, H y J no se indican letra para el día 12 ya que el dato corresponde a una única hembra y por tanto no fue tomada en cuenta para el análisis estadístico (Figura en la página 48).

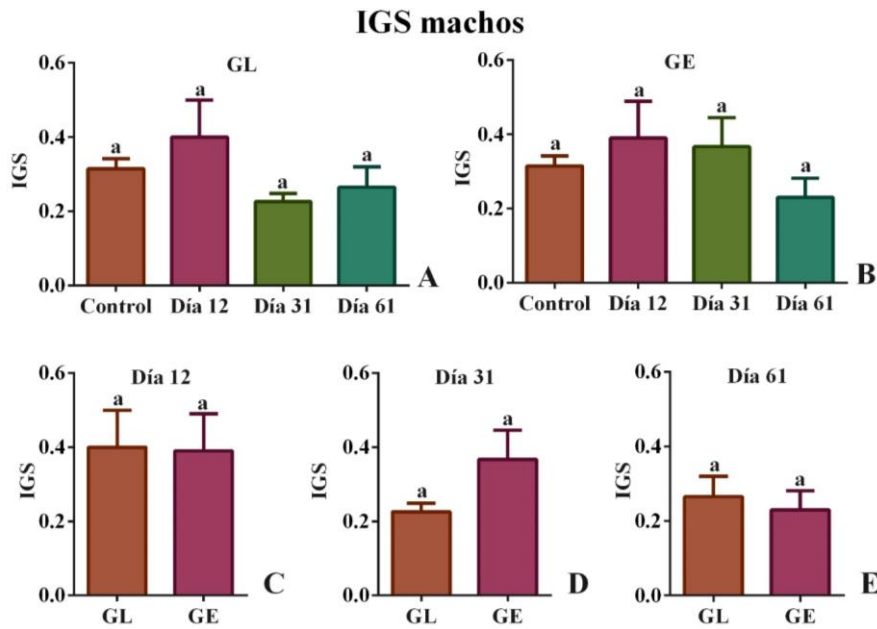
grupo, el número de ovogonias presentó una reducción significativa a los 31 días de ensayo respecto al control (Fig. 3.8.B), mientras que el número de ovocitos previtelogénicos finales mostró un incremento significativo al final de la experiencia respecto a los muestreos previos (Fig. 3.8.F). Por otra parte, el número de ovocitos vitelogénicos exhibió una reducción significativa a los 12 y 31 días del ensayo respecto al control en las hembras del GL (Fig. 3.8.G). En las hembras del GE, se observó un descenso significativo en el número de ovocitos vitelogénicos a los 61 días de ensayo respecto al muestreo anterior (Fig. 3.8.H). Por otra parte, resultó llamativo el incremento significativo del número de ovocitos en regresión registrado en las hembras del GL tras 12 días de confinamiento que luego descendió nuevamente a valores similares al control a los 31 días de ensayo, con un posterior aumento no significativo al final de la experiencia (Fig. 3.8.I). Finalmente, el número de ovocitos en regresión en el GE mostró un incremento significativo a los 61 días de experiencia (Fig. 3.8.J).

Cuando se comparó el número de ovogonias y ovocitos en distintos estadios de desarrollo entre hembras de distintos grupos de tratamiento para una misma fecha de muestreo no se observaron diferencias significativas.

Respecto a las frecuencias de los distintos tipos celulares y estadios de desarrollo, las ovogonias y los ovocitos en reabsorción fueron los menos frecuentes, a excepción de lo observado en el GL a los 12 días de muestreo. Los ovocitos previtelogénicos iniciales fueron los más prevalentes en ambos grupos de tratamiento y en todos los días de muestreo, con la excepción de los 31 días de ensayo en el GE donde los ovocitos que se visualizaron con más frecuencia fueron los vitelogénicos (Tabla 3.4).

**Tabla 3.4. Frecuencia relativa de ovogonias y distintos estadios de desarrollo de ovocitos en *Gymnotus* sp. bajo distintas condiciones de alojamiento.**

|                | Día       | Ovogonias | Ovocitos Previtelogénicos Iniciales | Ovocitos Previtelogénicos Finales | Ovocitos Vitelogénicos | Ovocitos en Reabsorción |
|----------------|-----------|-----------|-------------------------------------|-----------------------------------|------------------------|-------------------------|
| <b>Control</b> | <b>0</b>  | 3,8       | 50,9                                | 17,8                              | 27,2                   | 0,3                     |
| <b>GL</b>      | <b>12</b> | 2,2       | 47,1                                | 18,4                              | 15,3                   | 17,0                    |
|                | <b>31</b> | 3,4       | 54,4                                | 24,0                              | 16,6                   | 1,6                     |
|                | <b>61</b> | 2,6       | 61,4                                | 12,2                              | 18,1                   | 5,7                     |
| <b>GE</b>      | <b>12</b> | 0         | 66                                  | 20                                | 11                     | 3                       |
|                | <b>31</b> | 0,6       | 34,1                                | 13,6                              | 48,9                   | 2,8                     |
|                | <b>61</b> | 2,5       | 34,3                                | 36,2                              | 18,5                   | 8,5                     |

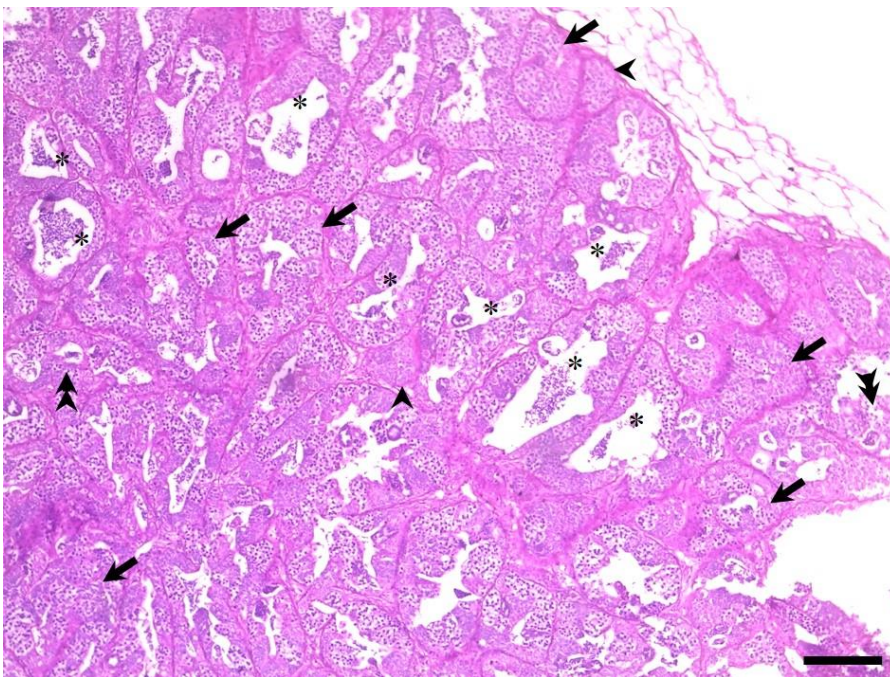


**Figura 3.9. Valores medios ( $\pm$ SEM) del IGS en machos por grupo de tratamiento (A, B) y días de muestreo (C, D, E). Letras distintas entre grupos indican diferencias estadísticamente significativas.**

Las medias de IGS en machos no mostraron diferencias significativas dentro de cada grupo experimental a lo largo de la experiencia (Fig. 3.9.A y 3.9.B). Cuando se compararon GL

y GE para un mismo día de muestreo tampoco se encontraron diferencias significativas (Fig. 3.9.C, 3.9.D y 3.9.E).

Respecto a los estadios de desarrollo de los túbulos seminíferos, también pudieron identificarse todos los descritos para la especie (Fig. 3.10).



**Figura 3.10. Estadios de desarrollo de túbulos seminíferos en *Gymnotus* sp.** Desarrollo inicial (cabezas de flecha), desarrollo intermedio (flechas), desarrollo final (asterisco) y túbulos en regresión (doble cabeza de flecha). Barra = 100  $\mu$ m.

A diferencia de lo descrito en hembras, no se observaron variaciones significativas en los estadios de desarrollo de túbulos seminíferos a lo largo de la experiencia dentro de cada grupo de tratamiento (Fig. 3.11), así como tampoco cuando se comparó cada estadio entre machos del GL y el GE para un mismo día de muestreo.

### Número de túbulos seminíferos en distintos estadios de desarrollo

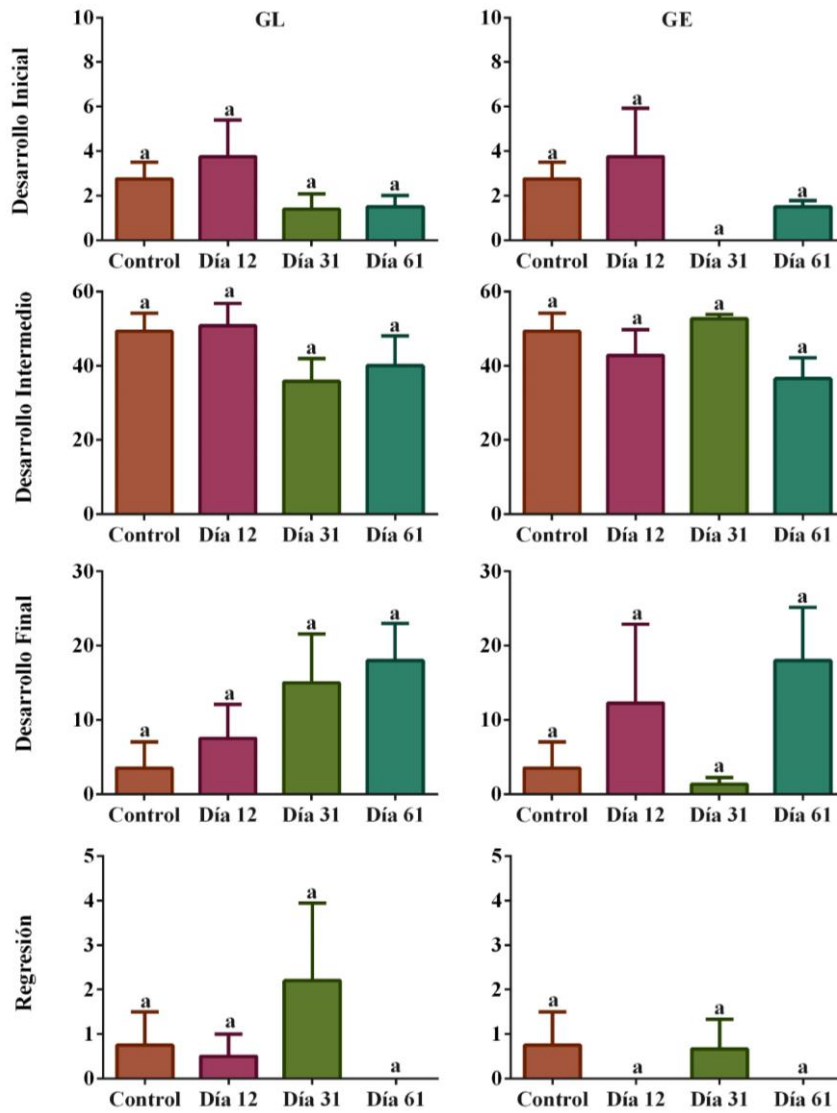


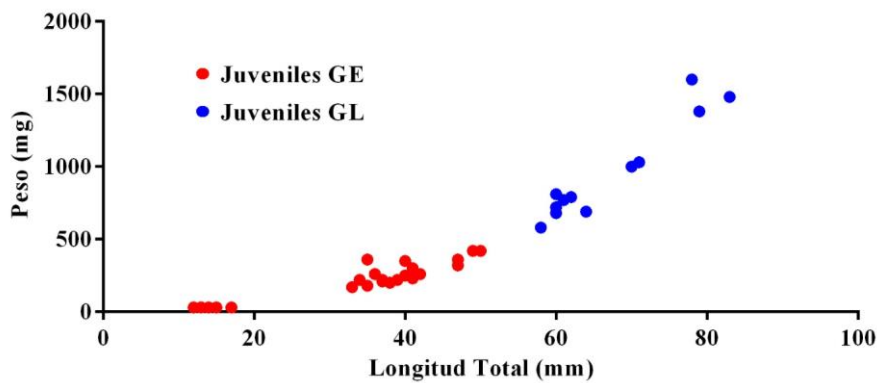
Figura 3.11. Valores medios ( $\pm$ SEM) del número de túbulos seminíferos en distintos estadios de desarrollo por grupo de tratamiento. Letras distintas entre días de muestreo indican diferencias estadísticamente significativas.

En relación a las frecuencias de los distintos estadios de desarrollo descritos, los túbulos seminíferos en desarrollo intermedio fueron los más prevalentes en ambos grupos de tratamiento y en todos los días de muestreo, con una tendencia al incremento de la frecuencia de los túbulos en desarrollo final a medida que avanzó la experiencia en ambos grupos de tratamiento (Tabla 3.5).

**Tabla 3.5. Frecuencia relativa de los distintos estadios de desarrollo de túbulos seminíferos en *Gymnotus* sp. bajo distintas condiciones de alojamiento.**

|         | Día | Desarrollo Inicial | Desarrollo Intermedio | Desarrollo Final | En Regresión |
|---------|-----|--------------------|-----------------------|------------------|--------------|
| Control | 0   | 4,8                | 87,3                  | 6,5              | 1,4          |
| GL      | 12  | 5,6                | 80,5                  | 13,1             | 0,8          |
|         | 31  | 2,8                | 66,8                  | 26,9             | 3,5          |
|         | 61  | 2,5                | 66,8                  | 30,7             | 0,0          |
| GE      | 12  | 6,3                | 74,8                  | 18,9             | 0,0          |
|         | 31  | 0,0                | 96,5                  | 2,3              | 1,2          |
|         | 61  | 2,7                | 66,1                  | 31,2             | 0,0          |

Finalmente, a los 126 días del inicio de la experiencia, se constató la existencia de eventos reproductivos en ambos grupos experimentales.



**Figura 3.12. Distribución de pesos y tallas de los alevines/juveniles de *Gymnotus* sp. recolectados en los estanques de los tratamientos GL y GE. Nótese la distribución trimodal de tallas en ambos grupos.**

Se recuperaron 31 alevinos/juveniles que presentaron una distribución de tallas trimodal, con LTm de 15, 38 y 58 mm en el estanque perteneciente a GE. En el estanque correspondiente a GL, se registró la existencia de 12 juveniles cuya LTm también exhibió una distribución similar, pero alcanzando valores medios de 63, 70 y 80 mm (Fig. 3.12).

#### 4. DISCUSIÓN.

---

La posibilidad de manejo de la reproducción de una especie de interés para la piscicultura se basa en la identificación de los reproductores maduros para aplicar las técnicas de reproducción artificial. Ésta otorga una ventaja estratégica para controlar el ciclo de producción. De acuerdo al ciclo de vida de la especie, los factores ambientales en condiciones de criadero no activan el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal o bien, los estímulos resultan insuficientes para la culminación del proceso reproductivo (Marcel, 1991). Debido a la importancia de producir alevinos de calidad y en cantidad en piscicultura, la posibilidad controlar la reproducción de manera artificial en condiciones de cautiverio posee especial relevancia.

##### 4.1. Efectos de factores ambientales y del tiempo y condiciones de cautiverio en la reproducción de *Gymnotus* sp.

Cuando se pueden imitar las condiciones naturales, los peces de ambientes lénticos no necesitan de la inducción hormonal para que ocurra la desova. La utilización de la reproducción artificial puede contribuir en la optimización de la producción, obteniendo mayor control sobre los reproductores, las desovas y los juveniles, así como también en la manipulación del periodo reproductivo (Andrade y Yasui, 2003).

Muchas especies sufren disfunciones reproductivas importantes al ser sometidas a sistemas de cultivo artificial. En general, es común que las hembras inicien el desarrollo gonadal en forma normal, pero no alcancen la maduración final, la ovulación y/o el desove. Por otra parte, los machos son mucho más resistentes al estrés producido por las condiciones ambientales del cultivo, pero producen un menor volumen de semen o bien de mala calidad. La manipulación de algunos factores ambientales como fotoperiodo, temperatura, salinidad, volumen del estanque, vegetación del sustrato, etc., pueden a menudo permitir la reproducción en cautiverio (Mylonas *et al.*, 2010) o mejorar la calidad de las desovas (Valdebenito, 2008).

La reproducción cíclica de los peces de agua dulce de regiones templadas es controlada por el fotoperiodo y/o la temperatura. Este tipo de reproducción ha sido descrita en muchas especies de peces tropicales de Sudamérica, África y el sudeste de Asia, pero en estas regiones

los ciclos de reproducción demostraron guardar relación con la existencia de estaciones muy marcadas, una seca y la otra lluviosa (Kirschbaum y Schugardt, 2002).

Numerosos autores han demostrado la influencia de los factores ambientales en la maduración y la regresión gonadal para diferentes especies de peces tropicales que poseen reproducción cíclica o continua, incluyendo cinco especies de Gymnotiformes sudamericanos (Kirschbaum 1975, 1979, 1984, 1987; Kirschbaum y Wieczorek, 2002; Kirschbaum y Schugardt, 2003). La maduración pudo inducirse experimentalmente disminuyendo la conductividad del agua, incrementando su nivel y con la simulación de precipitaciones. Estas tres características son representativas de las condiciones ambientales que manifiestan los cuerpos de agua en la época de lluvias que da lugar a la inundación de los valles aluviales. La regresión gonadal se logró con el incremento de la conductividad, simulando la bajante.

También fue demostrado que las condiciones ambientales, como temperatura del agua, fotoperiodo, disponibilidad de alimento y los periodos de lluvia y sequía, son los factores que determinan que las especies cultivadas de *Oreochromis* (tilapias, Cichlidae) se reproduzcan con mayor intensidad en ciertos periodos del año. En áreas tropicales, los periodos de precipitación y sequía son los que mayor influencia tienen en el desempeño reproductivo debido a la escasa diferencia en la duración del día y variación de la temperatura a lo largo del año. Por otra parte, en el subtropical y en regiones que se alejan del ecuador, la temperatura y el fotoperiodo son los factores más relevantes (Perea-Ganchou *et al.*, 2017).

Kirschbaum (1979) obtuvo la reproducción en cautiverio de *E. lineata* (Gymnotiformes). Como en su hábitat natural esta especie posee reproducción cíclica marcada por la época de lluvias, se imitaron las condiciones ambientales con entrada de agua destilada mediante spray para imitar la lluvia e incremento de nivel en las peceras. *E. lineata* se caracteriza por su madurez durante la estación de lluvias cuando el nivel del agua muestra un incremento sustancial, presentando gónadas en regresión en la estación seca. En este estudio, Kirschbaum (1979) utilizó dos grupos experimentales constituidos uno por peces capturados de ambientes naturales y otro por reproductores nacidos y criados en el laboratorio. Los peces importados de Sudamérica alcanzaron la maduración gonadal en el laboratorio, pero no desovaban o lo hacían a intervalos irregulares mientras que, los animales nacidos en cautiverio desovaron regularmente cada 3 o 4 días cuando se estimuló la reproducción en condiciones controladas, evidenciándose un efecto asociado al estrés post-captura. Aunque la reproducción

como proceso presenta variaciones, en general el número de desoves obtenidos fue mayor y el intervalo desde el primer día del experimento hasta la primera puesta menor en las hembras reproductoras nacidas y criadas en cautiverio.

La reproducción de *G. carapo* en cautiverio se logró en las mismas condiciones, pero sin imitación de lluvia, registrándose la primera desova 125 días después de la reducción de la conductividad (Kirschbaum y Wiczorek, 2002).

En nuestro trabajo, en la experiencia 1 se registraron resultados positivos a la inducción hormonal efectuada con un intervalo captura-inducción (ICI) de 1 semana, determinando cambios en algunas de las variables discutidas más adelante en el apartado 4.2. Por otra parte, cuando el ICI utilizado en el diseño experimental fue mayor, 16 y 8 semanas en las experiencias 2 y 3 respectivamente, no se lograron resultados positivos. Así, los tiempos de ICI afectaron de manera inversamente proporcional la respuesta a la inducción hormonal en la reproducción artificial de *Gymnotus* sp. en condiciones de cautiverio. Es importante destacar que la reducción de conductividad lograda en la experiencia 3 no fue suficiente para desencadenar los eventos reproductivos.

Sin embargo, en la experiencia 4, cuando se cambiaron las condiciones ambientales y se redujo drásticamente la conductividad del agua debido a las precipitaciones registradas durante el tiempo de adaptación de los animales al cautiverio, ocurrieron eventos reproductivos espontáneos previos a la inducción hormonal. En función de esto, la posibilidad de acumular agua de lluvia en una reserva puede ser una medida de manejo que permita controlar la reproducción en períodos que las precipitaciones sean escasas durante la época reproductiva. Además, durante esta experiencia, pudieron verificarse eventos reproductivos antes de los 100 días posteriores a la captura de los reproductores salvajes y más de dos en la misma temporada, en un lapso de 45 días. Estos hechos contrastan con lo descrito por de Souza y de Andrade (1984), quienes reportaron la reabsorción de los ovocitos en maduración después de la captura, y la recomendación de realizada por Rotta (2004) sobre la captura anticipada de reproductores para su adaptación previa al cautiverio. Por otra parte, el traslado de los mismos al laboratorio para la inducción, donde permanecieron 3 días hasta ser devueltos a los estanques, no afectó la maduración gonadal pues posteriormente se recolectaron juveniles de 12 mm de LT. Esto último, corrobora la ocurrencia de nuevos desoves en el período de 30 días transcurrido entre la devolución de los reproductores y la nueva captura.

Finalmente, en la experiencia 5 pudo comprobarse el efecto de las condiciones de alojamiento en el desarrollo gonadal de *Gymnotus* sp. y el éxito reproductivo. Así, las hembras confinadas en condiciones de laboratorio presentaron un incremento significativo de ovocitos en regresión, así como una reducción significativa del número de ovocitos vitelogénicos tras el inicio de la experiencia. Además, los ejemplares de este grupo pudieron reproducirse exitosamente luego de su traslado a estanques en condiciones semi-naturales. Por otra parte, en las hembras del GE, el cautiverio no mostró tener un efecto negativo en el número de ovocitos en regresión y es probable que en este grupo hayan ocurrido dos eventos reproductivos durante la experiencia teniendo en cuenta las diferencias de tallas y coloración de los alevinos/juveniles capturados al finalizar la misma.

#### **4.2. Variables seleccionadas para la evaluación de la reproducción.**

##### **4.2.1. Posición de la vesícula germinal en ovocitos.**

En las hembras, la posición del núcleo o vesícula germinativa de los ovocitos es uno de los criterios utilizados para decidir el momento preciso en el que se debe realizar la aplicación de hormonas durante la maduración de los ovocitos (Marcel, 1991). Los aspectos morfológicos del desarrollo de los ovocitos, incluyendo el desarrollo asociado de las células foliculares son esencialmente los mismos en todas las especies ovíparas de teleósteos. Cuando el ovocito ha completado su desarrollo, la estimulación hormonal desencadena la maduración del ovocito, tras la cual este será liberado en el lumen del ovario. El inicio de este estado está marcado por la migración del núcleo hacia la periferia del citoplasma y la fusión de la membrana nuclear al micrópilo (Barnabé, 1996).

La posición subperiférica de la vesícula germinativa indica el momento cercano a la ovulación. Para la mayoría de las especies, se considera que el momento óptimo para la aplicación hormonal de inducción en las hembras es durante las primeras horas de la mañana y como indicador del mismo, debiera coincidir cuando la vesícula germinal se encuentra migrando hacia el polo animal, en maduración (Valdebenito, 2008). La posibilidad de utilizar esta variable indicativa de la maduración se ve reducida a especies que pueden ser sometidas a biopsias ováricas para diagnóstico. En el caso de *Gymnotus* sp., la ubicación del poro genital

por debajo de la abertura branquial dificultó el acceso para realizar esta maniobra y el tamaño de los oviductos imposibilitó los intentos de realizarla.

En nuestro trabajo, con excepción de dos hembras que pudieron ser estrujadas, se pudieron registrar y analizar datos de %OVGPP luego de extraer las muestras de ovocitos de los ejemplares eutanasiados. Utilizando EBH para inducir la reproducción, en la experiencia 1 se demostró una tendencia al aumento del %OVGPP en las hembras de los grupos TEBH12 y TEBH20 con diferencias estadísticamente significativas respecto a las hembras control. Resultados similares fueron reportados por Pardo Carrasco *et al.* (2006) en hembras de *Brycon amazonicus* inducidas con EBH de carpa, donde se observaron valores significativamente superiores de ovocitos con vesícula germinal periférica respecto a las hembras controles. Esto podría estar vinculado a una señal de progreso hacia la maduración en el proceso ovulatorio después de recibir la aplicación de EBH, aunque no ocurrió ovulación durante las 20 horas en que se desarrolló la experiencia.

#### 4.2.2. Diámetro de ovocitos.

El diámetro de los ovocitos maduros se relaciona con la fecundidad porque el espacio disponible en la cavidad celómica limita el número y tamaño de los mismos (Vazzoler, 1996) y por ello la fecundidad varía con el tamaño de la hembra, aumentando con su crecimiento, más que con la edad del individuo. Sin embargo, existen diferencias que pueden ser inter e intra-específicas, con gradientes latitudinales dependiendo de la presión ambiente como en *Micropogonias furnieri* (Vazzoler y Agostinho, 1991) o entre periodos reproductivos sucesivos en poblaciones de *Sardinella janeiro*, donde el diámetro de ovocitos y la fecundidad mostraron una relación inversa en dos periodos reproductivos analizados, con ovocitos de diámetro menor cuando la fecundidad fue más elevada. Esta variación fue atribuida a cambios en la disponibilidad de alimento (Vazzoler y Rossi-Wongtschowski, 1976).

Entre 68 especies de peces estudiadas por Vazzoler (1996) en la cuenca del Paraná, las que se caracterizan por efectuar cuidados de su prole poseen diámetros de ovocitos promedio entre 1467,3  $\mu\text{m}$  en *E. lineata* (Sternopygidae) y 4789,3  $\mu\text{m}$  en *Megalancistrus parananus* (Loricariidae). En este estudio, *G. carapo* presentó un diámetro ovocitario mayor que los registrados en las experiencias 1 y 5 de nuestro trabajo, con valores promedio de 2785,5  $\mu\text{m}$ .

Aunque puedan existir diferencias intra-específicas, el diámetro de los ovocitos en nuestro estudio fue afectado por la administración de EBH ya que las hembras tratadas presentaron medias superiores respecto a las hembras control. Esto se condice con lo propuesto por Zanuy *et al.* (2009) ya que durante la fase del crecimiento secundario del folículo ovárico es esperable un aumento del volumen celular debido a la acumulación de vitelo durante su maduración. Resultados similares fueron reportados por Pardo Carrasco *et al.* (2006) quienes en un estudio comparativo de tratamientos hormonales realizados en *Brycon amazonicus* con EBH y un análogo de GnRH-a de mamífero, observaron que únicamente las hembras tratadas con EBH presentaron un crecimiento significativo del diámetro ovocitario.

En el ensayo 5, esta variable también presentó variaciones inducidas por el tiempo de cautiverio y las condiciones de alojamiento. Así, el diámetro de los ovocitos se incrementó en las hembras alojadas en condiciones semi-naturales más tempranamente (12 días de ensayo) que en aquellas confinadas en condiciones de laboratorio en las que se observaron cambios en la variable a partir de los 31 días de experiencia.

#### **4.2.3. Fecundidad absoluta.**

La fecundidad es un indicador de la cantidad de ovocitos que una hembra puede expulsar en la desova. Esta estimación se utiliza para evaluar el potencial reproductivo de una especie (Vazzoler, 1996). Para el cálculo de la fecundidad es necesario tener en cuenta al menos dos variables reproductivas, la cantidad de ovocitos maduros que están en condiciones de ser ovulados y el tipo de desova que posee la especie estudiada. Las especies con desova total expulsan todos los ovocitos en una sola puesta, mientras que, las de desova múltiple o parcelada lo hacen en diferentes lotes durante un período reproductivo.

Según Rotta (2004), la fecundidad absoluta representa el número total de ovocitos desovados por una hembra en la temporada reproductiva. En las especies que poseen desova parcelada como *Gymnotus* sp., la fecundidad absoluta es el indicador estimativo de elección, ya que evalúa la cantidad de ovocitos que serían liberados a lo largo de toda una estación reproductiva.

Barbieri y Barbieri (1982) determinaron una fecundidad absoluta de 820 a 3.040 ovocitos para hembras de *G. carapo* de 230 a 460 mm de LT. La fecundidad se consideró

relativamente baja, basándose en el número total de ovocitos por animal. En nuestra experiencia, esta variable registró valores entre 1000 y 2500 ovocitos en animales con LTm promedio de 203,3 mm, con una hembra que superó los 3000 ovocitos.

En nuestro trabajo, la fecundidad absoluta evaluada en la experiencia 5 no mostró diferencias estadísticamente significativas a lo largo del ensayo ni en las hembras alojadas en condiciones de laboratorio ni en aquellas cultivadas en condiciones semi-naturales. Sin embargo, las hembras del GE presentaron una fecundidad absoluta significativamente superior a las del GL a los 31 días de ensayo lo que podría estar vinculado a una mejor adaptación al cautiverio en dichas condiciones de cultivo.

#### **4.2.4. Índice gonadosomático.**

El IGS expresa la relación porcentual entre el peso de las gónadas y el peso total de un individuo. Este indicador refleja el estado funcional de las gónadas que aumentan de tamaño en cada ciclo reproductivo y, por lo tanto, puede utilizarse como herramienta para determinar la fase del desarrollo gonadal en la que se encuentra un reproductor en estudios poblacionales (Vazzoler, 1996). Luego, el estado de maduración se confirma por comparación con los análisis histológicos de las gónadas.

En las hembras, los ovarios pueden llegar a ocupar las dos terceras partes de la cavidad celómica. Su tamaño y disposición dependen del estadio de desarrollo gonadal (Menin, 1989). Este aumento de volumen se refleja notoriamente en el aumento del IGS. En cada desova se produce una marcada reducción del peso de los ovarios que vuelven a aumentar en el ciclo reproductivo siguiente. Así, para cada estadio del ciclo los valores de IGS se mantienen prácticamente constantes (Vazzoler, 1996).

En estudios previos realizados en hembras de *G. carapo* capturadas en diferentes estadios de reproducción entre las desembocaduras de los ríos Paranapanema e Iguazú se observaron valores medios de IGS de 0,5 en maduración, 3,72 en reproducción, 0,96 desovado y 0,35 en reposo (Vazzoler y Agostinho, 1991). Valores similares fueron reportados por González *et al.* (2001) quienes describieron el IGS para hembras de *G. carapo* de una laguna perteneciente a la Cuenca del Riachuelo (Corrientes, Argentina) en distintos estadios de desarrollo gonadal durante un año. El IGS fue de 0,45 a 0,95 en maduración, mientras que en

ejemplares maduros presentó valores de IGS entre 3 y 7. En su trabajo sólo se evaluaron el estado de maduración ovárica, permitiendo verificar que la especie presenta un período de actividad reproductiva prolongado durante toda la primavera y el verano. Ishiba *et al.* (2009) analizaron ejemplares adultos de ambos sexos de esta especie capturados mensualmente durante 2 años, en el distrito de Río Bonito (Sao Paulo, Brasil). El IGS máximo de hembras fue de 4,19. Al igual que, González *et al.* (2001) y Silva *et al.* (2003), encontraron que los valores medios más elevados para este parámetro coincidieron también con el periodo de mayor temperatura. Los valores de IGS registrados en los diferentes trabajos con picos durante los periodos de temperaturas más elevadas son indicativos de reproducción estacional (Ishiba *et al.*, 2009). La comparación de los datos morfométricos con los análisis histológicos permitió constatar el patrón de reproducción estacional descrito inicialmente por Barbieri y Barbieri (1983).

En nuestro trabajo, los valores de IGS registrados en las experiencias 1 y 5 indicaron que todas las hembras se encontraban en estadio “de maduración” o “maduro”.

A diferencia de lo descrito precedentemente para el %OVGPP y el diámetro de ovocitos, con la administración de EBH en la experiencia 1 no se observaron diferencias significativas en el IGS de hembras tratadas respecto de las del grupo control. En estudios realizados en hembras adultas de anguila europea (*Anguilla anguilla*), Asturiano *et al.* (2002) describieron un incremento significativo del IGS en hembras tratadas con EBH de salmón y hCG con valores del 20 al 25 % en comparación con las hembras que al inicio de la experiencia mostraron un IGS del 1%. Sin embargo, a diferencia de nuestro trabajo en el que se realizaron sólo dos aplicaciones de EBH, Asturiano *et al.* (2002) realizaron una aplicación semanal, pero durante cuatro meses, por lo que en las diferencias reportadas podrían estar influyendo otras variables como el tiempo de maduración gonadal. Esto podría sugerir que la EBH en las dosis y plazos empleados en nuestro trabajo puede inducir cambios a nivel celular en el ovocito, pero sin modificar el peso del ovario. Un aumento significativo del IGS podría vincularse con la progresión hacia la maduración final y el desove en hembras sometidas a inducción hormonal.

Por otra parte, las condiciones de mantenimiento en cautiverio utilizadas en la experiencia 5 afectaron de manera diferencial el IGS en hembras. Así, en las hembras mantenidas en ambientes semi-naturales se observó un incremento significativo del IGS tras 31 días de ensayo. En cambio, las hembras alojadas en el laboratorio no presentaron diferencias en

esta variable mientras estuvieron en estas condiciones, y sólo aumentaron su IGS luego de 30 días de haber sido transferidas a estanques exteriores (61 días de experiencia).

Al igual que lo descrito en hembras durante la experiencia 1, la administración de EBH no produjo diferencias significativas en el IGS de machos inducidos hormonalmente respecto de los controles. Sin embargo, a diferencia de lo observado en hembras, las condiciones de alojamiento no modificaron significativamente el IGS en machos.

Los valores de IGS registrados en machos en nuestro estudio variaron de 0,2 a 0,4 y coinciden con datos previos publicados para la especie correspondiendo al estadio avanzado de maduración gonadal (Ishiba *et al.*, 2009). Según Resende *et al.* (2006) el tipo de desova parcelada con desarrollo de cuidados parentales de las crías, como el que sucede en *Gymnotus* sp., ocurre conjuntamente con un desarrollo menor de las gónadas en los machos. Los bajos valores e ínfimas variaciones del IGS en machos corroboran un menor desarrollo gonadal en el ~~sexo masculino~~ macho (Ishiba *et al.*, 2009).

#### 4.2.5. Niveles séricos de LH.

La concentración de LH reflejaría el pico de aumento característico de esta hormona en las fases finales de la reproducción (Muñoz Cueto, 2009) desencadenando la producción de progesterona que precede a la ovulación en hembras y la espermiación en machos.

En la primera experiencia de nuestro trabajo se evaluó el contenido de LH sérica después de la administración de EBH. ~~¶~~ No se observaron variaciones significativas en los niveles séricos de LH inducidas por la administración de EBH en la experiencia 1 en ambos entre grupos control, TEBH12 y TEBH20 en ambos sexos. Asimismo, tampoco se observaron diferencias entre machos y hembras del grupo control ni en los tratados dentro de los grupos.

Como los niveles de LH plasmática se mantuvieron en el grupo control y los grupos sometidos a tratamiento, al igual que los IGS no presentaron diferencias estadísticamente significativas, se puede presuponer que los ejemplares inducidos no maduren por efecto de las ~~las dosis aplicaciones~~ de EBH ~~con las dosis~~ utilizadas y/o las condiciones ambientales en que se efectuaron las aplicaciones.

**Comentado [U1]:** Las concentraciones de LH no cambiaron entre GC, TEBH12 y TEBH20. No hay efecto de tratamiento, ya sea por dosis aplicadas o condiciones en las que se realizó la experiencia.

#### 4.2.6. Parámetros de calidad seminal.

La descripción de los parámetros para cuantificar la viabilidad de los espermatozoides es importante para el éxito de la reproducción artificial de peces. La calidad del semen está determinada por la motilidad progresiva (Billard *et al.*, 1995; Cosson *et al.*, 1999), el vigor y la morfología espermáticos (Cosson *et al.*, 1999) y la concentración de espermatozoides (Streit-Jr. *et al.*, 2008). La motilidad progresiva de los espermatozoides es la característica de mayor importancia en la calidad del semen; el vigor espermático indica la fuerza del movimiento; los defectos morfológicos reducen la motilidad y la posibilidad de fertilización (Cosson *et al.*, 1999). El análisis morfológico no es habitual en la reproducción de peces (Kavamoto *et al.*, 1999).

En nuestro trabajo, únicamente se pudo realizar la extracción de semen a los ejemplares de los grupos inyectados con EBH durante la experiencia 1. Los valores promedio de motilidad espermática fueron superiores al 90% en ambos tratamientos, similares a los descritos en otros estudios en los que utilizó EBH como inductor (Murgas *et al.*, 2004; Shaliutina *et al.*, 2012), por lo que se consideran muy satisfactorios en comparación con otros estudios previamente publicados. Streit-Jr. *et al.* (2008) reportaron que la inducción con EBH en *Leporinus elongatus* produjo una reducción de la motilidad espermática encontrando valores de la variable de 53,72% y 36,72%, antes y después de la inducción hormonal, respectivamente. Linhart y Billard (1994) describieron una motilidad espermática promedio del 80% en ejemplares de *Silurus glanis* inducidos con EBH.

La concentración media de espermatozoides, entre 2 y  $2,2 \times 10^6$  espermatozoides  $\text{ml}^{-1}$ , fue notoriamente más baja que la descrita para *Brycon orbignyanus* con una concentración media de  $8,21 \times 10^9$  espermatozoides  $\text{ml}^{-1}$  (Murgas *et al.*, 2004). Esto puede relacionarse con las diferentes características reproductivas de las especies, ya que el salmón de río es una especie reófila con una desova anual (Vazzoler, 1996).

Con todo, nuestro trabajo es el primero en describir parámetros de calidad de semen en *Gymnotus* sp.

#### **4.3. Aplicación de diferentes hormonas y protocolos para la reproducción de *Gymnotus* sp.**

La reproducción en teleósteos migradores de única puesta se induce fácilmente con EBH en la época de maduración (Murgas *et al.*, 2012). La acción de las hormonas es la señal necesaria

para la ovulación y la puesta porque el proceso de maduración se inicia con el cambio de fotoperiodo y la elevación de la temperatura. En cautiverio, el proceso no culmina con la desova porque falta el estímulo que genera la migración (Marcel, 1991).

Los peces tropicales que poseen desova parcelada tienen reproducción cíclica y la época de lluvias determina los factores ambientales proximales que desencadenan la reproducción cambiando los parámetros fisicoquímicos del agua. Las precipitaciones, los cambios de nivel hidrométrico y la conductividad poseen gran influencia. Estos factores, individualmente o combinados, son disparadores de las puestas en diferentes géneros de peces eléctricos (Kirschbaum *et al.*, 2008).

En los peces con reproducción cíclica los ovocitos maduran en diferentes lotes a lo largo de una temporada reproductiva extensa. Las puestas se suceden a intervalos irregulares dependiendo de la existencia de las condiciones ambientales apropiadas (Kirschbaum, 1979). Las señales para un evento reproductivo también podrían depender de la influencia de interacciones sociales entre individuos (Andrade y Yasui, 2003).

Según de Souza y de Andrade (1984), cuando los ejemplares de *G. carapo* son capturados se produce la reabsorción de los ovocitos en maduración. Cuando los ejemplares se adaptan al nuevo ambiente, comienza una nueva maduración de las gónadas. Rotta (2004) recomendó la captura de reproductores antes del invierno para comenzar la temporada de reproductiva siguiente con animales previamente adaptados.

Con la aplicación de EBH en la primera experiencia se detectaron aumentos del %OVGPP y del diámetro de ovocitos y se efectuó extracción de semen. Si bien no se logró la fecundación de los ovocitos, estos resultados alentaron la realización de nuevos ensayos para dilucidar si las diferencias observadas en las variables analizadas eran consecuencia de las inyecciones hormonales y se podría lograr inducir desovas utilizando otras hormonas, actuando sobre el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal a diferente nivel, con distintos tiempos de acción y concentración (Díaz y Neira, 2005).

En la siguiente experiencia, se incorporó la inducción con GnRH sintética siguiendo los protocolos utilizados por Sampaio Paulino *et al.* (2011) para *P. mesopotamicus*, *B. orbignanus* y *P. lineatus*. Como la GnRH actúa a nivel de la hipófisis sobre la producción de GTHs se utiliza con éxito para elevar la producción de esperma a largo plazo y producir desovas múltiples en especies con desova asincrónica o para desova de especies que poseen desova múltiple (Zohar

y Mylonas, 2001). En nuestro trabajo, no se logró inducir desoves en hembras ni extracción de semen en los machos mediante la inyección de esta hormona en los tiempos estipulados para la experiencia. Resultados similares fueron reportados por Pardo Carrasco *et al.* (2006) quienes utilizando seis protocolos distintos en hembras de *B. amazonicus* inducidas con GnRH $\alpha$  no obtuvieron desoves. Para tener oportunidad de lograr reproducciones con la utilización de GnRH sería necesario investigar acerca del periodo necesario desde la aplicación hasta que la hormona produzca efecto en la producción de las GTHs que conduzcan a la maduración gonadal para la producción del desove (Mylonas *et al.*, 2010). Para obtener desovas en cautiverio, es necesario regular los puntos clave para la estimulación de la maduración y la puesta. Para la reproducción de peces de ambientes lénticos en ambientes artificiales se pueden controlar los factores proximales que actúan como disparadores de la misma (Barnabé, 1996). En función de ello, teniendo en cuenta los resultados previos obtenidos, en la experiencia 3 se simuló en condiciones de laboratorio un fotoperiodo de primavera, 12 horas luz: 12 horas oscuridad, y se redujo la conductividad del agua previamente a la inducción hormonal, la cual se realizó en febrero cuando el agua alcanzó las temperaturas más cálidas que se registran dentro de las instalaciones. La disminución de la conductividad obtenida en nuestro trabajo fue en promedio  $26,3 \mu\text{S cm}^{-1}$  no mostrando los ejemplares una maduración gonadal adecuada. Kirschbaum y Wieczorek (2002) obtuvieron desoves naturales en ejemplares de *G. carapo* cuando la reducción de la conductividad osciló entre 80 y  $380 \mu\text{S cm}^{-1}$ . Esto podría indicar que el descenso en los valores de conductividad manipulados en nuestro ensayo no fue suficiente para estimular la maduración gonadal que permita mejorar los resultados de la inducción hormonal.

En línea con esta hipótesis, durante la experiencia 4 de nuestro trabajo donde los ejemplares se mantuvieron en condiciones semi-naturales y estuvieron sometidos a una reducción promedio de la conductividad de  $150,7 \mu\text{S cm}^{-1}$ , se obtuvieron reproducciones exitosas constatadas por la presencia de alevinos/juveniles en el 83% de los estanques. De acuerdo con las diferencias de tamaño y patrón de coloración de los ejemplares recolectados, en este periodo se obtuvieron eventos reproductivos de manera anticipada a lo descrito en la bibliografía existente (de Souza y deAndrade, 1984; Kirschbaum y Wieczorek, 2002).

Un embrión de *G. carapo* con saco vitelino puede medir entre 3 y 5 mm. Las crías hasta las 3 semanas de edad llegan a una LT de 17 mm y son de color marrón uniforme. A las 4 semanas y media, con una LT de 21 mm aparecen las bandas características en la parte superior del cuerpo. La coloración se va intensificando, pero se mantiene limitada a la región dorsal del

cuerpo. Cuando el pez alcanza los 54 mm, a las 10 semanas y media, las bandas llegan ventralmente hasta la aleta anal. A las 15 semanas y media miden 90 mm y el patrón de coloración es más intenso (Kirschbaum y Wieczorek, 2002). La edad de los alevines recuperados en la experiencia 4 fue de aproximadamente 6 a 7 días hasta de 30 días de edad, estimada de acuerdo con la coloración y LT de los mismos, 12 a 23 mm (Kirschbaum y Wieczorek, 2002). La reproducción en los estanques habría comenzado alrededor, de los 75 días luego del confinamiento en cautiverio de los reproductores salvajes. En el ensayo de Kirschbaum y Wieczorek (2002), luego de la disminución de conductividad transcurrieron algo más de 120 días hasta que ocurrieron los primeros eventos reproductivos, acumulando 18 meses en cautiverio hasta que se produjo la primera reproducción. Sin embargo, es importante resaltar que los juveniles nacidos en los estanques en condiciones semi-naturales en nuestro ensayo pueden presentar tallas mayores a las edades descritas por Kirschbaum y Wieczorek (2002) dado que disponían de alimento natural desarrollado a partir de la producción primaria en los estanques desde el momento que reabsorbieron el saco vitelínico.

#### **4.4. Efectos del estrés sobre el desarrollo gonadal.**

Factores estresantes influyen negativamente sobre funciones que no son vitales cuando superan los límites de la homeostasis. Un animal puede soportar por adaptación cierto nivel base o umbral de agentes estresantes y desarrollarse normalmente. Superados los límites de ese umbral, la manifestación del estrés comienza afectando primero al crecimiento y la reproducción (Schreck, 2010). Las alteraciones en el ambiente o el manejo en piscicultura pueden afectar la reproducción de manera diferente según la especie, dependiendo de la respuesta fisiológica natural o la estrategia que posea para hacer frente al agente estresante, demorando o acelerando el proceso reproductivo, o bien inhibiéndolo completamente (Schreck *et al.*, 2001). En la experiencia 5, se compararon las condiciones semi-naturales ya utilizadas en la experiencia 4 con las condiciones de confinamiento y manipulación de los animales en laboratorio para constatar si el estrés podría ser la causa de la falta de respuesta a las inducciones hormonales.

Entre las variables reproductivas cuantificadas, el IGS puede ser utilizado como método de evaluación de la respuesta al estrés en peces como medida del peso de un órgano afectado (Harper y Wolf, 2009). En nuestra experiencia, el confinamiento en condiciones de laboratorio

demostró efectos negativos en el IGS de hembras. Este efecto se revirtió cuando las reproductoras de GL fueron colocadas en los estanques exteriores. En los machos, aunque sin diferencias significativas, se pudo observar que los de GE tuvieron mayor IGS al principio y existió una tendencia de aumento en GL también, cuando fueron cambiados a los estanques. El diámetro de los ovocitos, al igual que los diferentes estadios ovocitarios reconocidos en cada muestreo, se diferenciaron a lo largo de la experiencia, denotando un desarrollo anticipado de GE con respecto a GL. El número de ovocitos no presentó estas diferencias, dado que en el desarrollo normal de peces con desarrollo asincrónico se encuentran células en los diferentes estadios de la ovogénesis desde la madurez sexual hasta la senescencia (Vazzoler, 1996) y cuando las condiciones son favorables para la reproducción reinician la meiosis hasta la ovulación.

Según Valdebenito (2008) los machos, en condiciones de cultivo, producen menor volumen de semen, o bien de mala calidad, pero son mucho más resistentes que las hembras al estrés producido por el confinamiento. En los machos de *Gymnotus*, el desarrollo espermático transcurrió normalmente a lo largo de toda la experiencia. Este hecho y la obtención de semen luego de la hipofisación en la experiencia 1, podría relacionarse con una rápida recuperación o escasa repercusión del estrés provocado por la captura. Zupa *et al.* (2017) analizando reproductores salvajes y criados en cautiverio de *Seriola dumerili* hallaron que el IGS de los machos mostró aumentos significativos en ambos casos desde la gametogénesis temprana hasta gametogénesis avanzada, seguidos de una disminución después de la reproducción, aunque los valores de IGS fueron significativamente mayor en los salvajes. La apariencia histológica de los testículos durante la gametogénesis también fue similar para los reproductores de ambos orígenes, pero la cantidad de espermatozoides fue mayor en los salvajes. Los reproductores criados en cautiverio interrumpieron la gametogénesis con anterioridad a los salvajes durante la fase de desovas.

Ishiba *et al.* (2009) reportaron que entre los meses de noviembre y abril los machos de *G. carapo* extraídos de ambientes naturales y eutanasiados inmediatamente presentaron de 45 a 95 % de los túbulos seminíferos en estadio de desarrollo final conjuntamente con 15 a 35 % en estadio de desarrollo intermedio. En nuestro trabajo, el estadio de desarrollo intermedio fue el más prevalente, sugiriendo una menor producción espermática.

La regulación del control de la reproducción en *Gymnotus* sp. aparenta ser más compleja que en otras especies estudiadas. Dado que se trata de una especie con desova parcelada con múltiples puestas anuales, las señales para la reproducción deben ser percibidas y procesadas muy rápidamente para poder aprovechar los momentos ideales para la desova y fecundación que se dan a lo largo de una extensa temporada reproductiva. Los sistemas sensoriales detectan los eventos ambientales basados en patrones de actividad neuronal en el sistema nervioso central que se ven afectados por dichos eventos (Caputi, 2004). Los cambios abruptos en la conductividad del agua actuarían como un factor disparador que desencadena las puestas. En ese momento, los órganos eléctricos podrían tener también una función homóloga a las feromonas de los mamíferos, pues poseen capacidad para reconocer señales eléctricas propias y no propias (Caputi y Nogueira, 2012). De esta forma, la percepción electrosensorial en *Gymnotus* sp. cumpliría un rol decisivo en el desarrollo final del proceso reproductivo.

## 5. CONCLUSIONES.

---

La utilización de la reproducción artificial en *Gymnotus* sp. en laboratorio no resulta factible siguiendo los protocolos de inducción hormonal utilizados en este trabajo.

El manejo de la conductividad eléctrica del agua se podría utilizar como táctica de inducción en momentos de la época reproductiva que no se produzcan abundantes precipitaciones, siempre y cuando se cuente con suficientes reservas de agua de lluvia.

El alojamiento en condiciones de laboratorio afecta negativamente el desarrollo gonadal en hembras, pero el mismo es reversible cuando se transfieren los ejemplares a estanques en condiciones semi-naturales.

El confinamiento de los reproductores en estanques pequeños y condiciones semi-naturales podría constituir una práctica alternativa para reproducción, que permita obtener alevinos en cantidad para efectuar recría y engorde. Bajo estas condiciones, es posible obtener varias reproducciones durante la misma temporada que se capturan los reproductores y de manera anticipada a lo reportado previamente en condiciones de laboratorio.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

---

- Almirón, A., Casciotta, J., Ciotek, L., & Giorgis, P. (2008). *Guía de los Peces del Parque Nacional Pre-Delta*. Buenos Aires: Administración de Parques Nacionales.
- Andrade, D. R., & Yasui, G. S. (2003). O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 27(2), 166–172. Retrieved from <http://pt.scribd.com/doc/7419003/Piscicultura-Inducao-de-Peixes-Hipofise-ada>
- Asturiano, J. F., Pérez, L., Tomás, A., Zegrari, S., & Jover, F. J. E. M. (2002). Inducción hormonal de la maduración gonadal y la puesta en hembras de anguila europea *Anguilla anguilla* L., 1758 : cambios morfológicos y desarrollo oocitario. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.*, 18(1-4), 127–137.
- Auró, A., & Ocampo, L. (1999). Diagnóstico del estrés en peces. *Veterinaria México*, 30(4), 337–344. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42330411>
- Baigún, C. R. M., Sverlij, S. B., & López, H. L. (2003). *Recursos pesqueros y pesquerías del Río de la Plata interior y medio (margen Argentina)*. Retrieved from <http://www.ecopuerto.com/bicentenario/informes/recpesqriodelaplata.pdf>
- Barbieri, G., & Barbieri, M. C. (1982). Fecundidade e tipo de desova de *Gymnotus carapo* (Linnaeus, 1758), na represa do Lobo, Estado de São Paulo (Pisces, Gymnotidae). *Spectrum: Jornal Brasileiro de Ciência*, 2(7), 25–29.
- Barbieri, G., & Barbieri, M. C. (1983). Dinâmica da reprodução de *Gymnotus carapo* na represa do Lobo, Estado de São Paulo. Influência de fatores abióticos. (Pisces, Gymnotidae). *Tropical Ecology*, 24(2), 244–259.
- Barnabé, G. (1996). CUARTA PARTE: Bases biológicas de la acuicultura de los peces. In *Bases biológicas y Ecológicas de la Acuicultura* (p. 536). ACRIBIA.
- Barton, B. A., & Iwama, G. K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann. Rev. Fish Dis.*, (1), 3–26.
- Bechara, J. A., Vargas, F., & Flores Quintana, C. (2007). *Biología pesquera de las principales*

*especies de importancia económica en el área de la confluencia de los ríos Paraná y Paraguay*. Retrieved from [http://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/pesca\\_continental/proyectos](http://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/pesca_continental/proyectos)

- Billard, R., Cosson, J., Crim, L. W., & Suquet, M. (1995). Sperm physiology and quality. In R. J. Bromage, N. y Roberts (Ed.), *Broodstock management and egg larval quality* (p. 424). Oxford: Blackwell Science.
- Bonetto, A. A., Roldan, D., & Oliver, M. E. (1978). Estudios limnológicos en la cuenca del riachuelo (Corrientes, Argentina) 1. Poblaciones de peces en ambientes leníticos y loticos. *Ecosur*, 5(9), 1–15.
- Bryan, J. L., Wildhaber, M. L., & Noltie, D. B. (2005). Examining Neosho Madtom Reproductive Biology Using Ultrasound and Artificial Photothermal Cycles. *North American Journal of Aquaculture*, 67(3), 221–230. <https://doi.org/10.1577/A04-020.1>
- Caputi, A. A. (2004). Contributions of electric fish to the understanding sensory processing by reafferent systems. *Journal of Physiology Paris*, 98, 81–97. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2004.03.002>
- Caputi, Á. A., Castelló, M. E., Aguilera, P. A., Pereira, C., Nogueira, J., Rodríguez-Cattaneo, A., & Lezcano, C. (2008). Active electroreception in *Gymnotus omari*: Imaging, object discrimination, and early processing of actively generated signals. *Journal of Physiology Paris*, 102(4–6), 256–271. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2008.10.005>
- Caputi, A. A., & Nogueira, J. (2012). Identifying self- and nonself- generated signals: Lessons from Electrosensory Systems. In C. López-Larrea (Ed.), *Sensing in Nature* (pp. 107–125). Landes Bioscience and Springer Science+Business Media.
- Carrillo, M. A., Muñoz Cueto, S., Zanuy, M., Rocha, G., Molés, M., Zanuy, S., ... Valdebenito Isler, I. (2009). *La reproducción de los peces: Aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura*. (M. A. Carrillo & J. Espinosa de los Monteros, Eds.). Madrid: Fundación Observatorio Español de Acuicultura.
- Castagnolli, N. (1992). *Piscicultura de água doce*. Jaboticabal: FUNEP.
- Chaube, R., Joy, K. P., & Goddard, M. E. (2015). Catfish Gonadotrophins: Cellular Origin, Structural Properties and Physiology mama. *Journal of Neuroendocrinology*, 27(6), 536–543. <https://doi.org/10.1111/jne.12286>

- Cognato, D. D. P. (2005). Biología reproductiva de *Gymnotus* aff. *carapo* Linnaeus, 1758 (Teleostei: Gymnotidae) do Parque Estadual de Itapuã, Rio Grande do Sul, Brasil, 1758, 73.
- Cognato, D. de P., & Fialho, C. B. (2006). Reproductive biology of a population of *Gymnotus* aff. *carapo* (Teleostei: Gymnotidae) from southern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 4, 339–348.
- Cosson, J., Dreanno, C., Billard, R., Suquet, M., & Cibert, C. (1999). Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors. In C. GAGNON (Ed.), *The male gamete: From basic science to clinical applications* (p. 500). París: Cache River Pres.
- de Souza, E. D., Junior, D. P. S., de Moraes, G. V., Ribeiro, R. P., Povh, J. A., Cardozo, R. M., ... Mendez, L. D. V. (2003). Extratos de hipófise de frango e coelho na indução reproductiva da carpa comum (*Cyprinus carpio*). *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 25(1), 99–107.
- de Souza, J. R., & de Andrade, D. R. (1984). Produção de sarapó *Gymnotus carapo* (Pisces: Gymnotidae) em cativeiro. *Revista Ceres*, 31(176), 308–309.
- Díaz, N. F., & Neira, R. (2005). Biotecnología Aplicada a la Acuicultura I. Biotecnologías clásicas aplicadas a la reproducción de especies cultivadas. *Cien. Inv. Agr.*, 32(1), 45–59.
- Drummond, M. M. Pereira, G. J. M. Felizardo, V. O., Murgas, L. D. S., Logato, P. V. R. Okamura, D., & Silveira, U. S. (2007). Morfología espermiática de jaú *Zungaro jahu* - análise do semen in natura e pós-descongelado. In *Anais do I Congresso Brasileiro de Produção de Peixes de Água Doce*. Dourados-MS: UFMS.
- Dunjo, J. A. (2015). La actividad turística de la Región Litoral. *Ciencias Económicas*, 02(12), 43–64. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5523095.pdf>
- Escobar, E., Regidor, H. A., Iwaszkiw, J., & Mosa, S. G. (2016). Análisis comparativo de la fecundidad del Sábalo *Prochilodus lineatus* en ambientes Lóticos y Lénticos de la Argentina. *Revista AquaTIC*, (34).
- FAO. (2010). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2010*. Retrieved from [www.fao.org/docrep/013/i1820s/i1820s.pdf](http://www.fao.org/docrep/013/i1820s/i1820s.pdf)

- FAO. (2012). *El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura - 2012. Food and Agriculture Organization of United Nations*. <https://doi.org/978-92-5-308275-9> ISSN1020-5500
- FAO. (2016). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma*. <https://doi.org/978-92-5-306675-9>
- Felizardo, V. O., Mello, R. A., Murgas, L. D. S., Andrade, E. S., Drumond, M. M., & Rosa, P. V. (2010). Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. *Animal Reproduction Science*, *122*, 259–263. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.020>
- Fedulner, P. G. D., Kirschbaum, F., & Tiedemann, R. (2008). Adaptive radiation in the Congo River: An ecological speciation scenario for African weakly electric fish (Teleostei; Mormyridae; *Campylomormyrus*). *Journal of Physiology Paris*, *102*(4–6), 340–346. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2008.10.002>
- Fontenele, O. (1953). Contribuição para o conhecimento da biologia do curimatã pacu, *Prochilodus argenteus*, Spix apud Spix & Agassiz, (Pisces: Characidae, Prochilodinae). *Rev. Brasil. Biol.*, *13*(1), 87–102.
- Fontenele, O. Injecting pituitary (hypophyseal) hormones into fish to induce spawning , 1955, 17 Progr. Fish-Cult. § (1955).
- Garádi, P., & Nunes, Z. M. P. (1986). Resultados preliminares da propagação artificial do mandiaçu, *Duopalatinus emarginatus*, Valenciennes, 1840. *Estudos de Piscicultura. Brasília: Codevasf*, 71.
- Gonzalez, A., Roux, J., & Sanchez, S. (2001). Evaluacion de algunos aspectos biologicos de la morena ( *Gymnotus carapo* , Linnaeus 1758 ). Morfología e histología de ovario, 4.
- Grier, H. J. (2002). The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. In R. L. Creswell (Ed.), *Proceedings of the fifty-third annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute* (pp. 537–552). Fort Pierce.
- Grier, J. H., Uribe, M. C., & 2009., P. R. (2009). The ovary, folliculogenesis and oogenesis in teleosts. In B. J. M. Jamieson (Ed.), *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes) Phylogeny Reproductive System Viviparity Spermatozoa*.

- (pp. 25–84). Science Publishers, Enfield.
- Harper, C., & Wolf, J. C. (2009). Morphologic effects of the stress response in fish. *ILAR Journal*, 50(4), 387–396. <https://doi.org/10.1093/ilar.50.4.387>
- Hoo, J. Y., Kumari, Y., Shaikh, M. F., Hue, S. M., & Goh, B. H. (2016). Zebrafish: A Versatile Animal Model for Fertility Research. *BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9732780>
- Ihering, R. Von. A method for inducing fish to spawn, *Progr. Fish-Cult.* § (1937).
- Ihering, R. Von, & Azevedo, P. (1934). A curimatã dos açudes nordestinos (*Prochilodus argenteus*). *Arq. Inst. Biol. São Paulo*, (5), 143–184.
- Ihering, R. Von, & Azevedo, P. (1936). As piabas dos açudes nordestinos (Characidae, Tetragonopterinae). *Arch. Inst. Biol.*, 7, 75–106.
- Ishiba, R., Quagio-Grassiotto, I., & França, G. F. (2009). ASPECTOS ESTRUTURAIS DO DESENVOLVIMENTO GONADAL E RELAÇÃO GONADOSSOMÁTICA DE MACHOS E FÊMEAS AO LONGO DO CICLO REPRODUTIVO ANUAL EM *Gymnotus* sp. ( TELEOSTEI : GYMNOTIFORMES , GYMNOTIDAE ). STRUCTURAL ASPECTS OF GONADAL DEVELOPMENT AND GONADOSOMATIC RATIO, 5096–5099.
- Iwaszkiw, J. M., & Firpo Lacoste, F. (2011). La pesca artesanal en la Cuenca del Plata (Argentina) y sus implicancias en la conservación de la biodiversidad. *Revista Del Museo Argentino de Ciencias Naturales*, 13(1), 21–25. Retrieved from [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1853-04002011000100003](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1853-04002011000100003)
- Iwaszkiw, J. M., Zappietro, E. G., Ferriz, R. A., & Chiaramonte, G. E. (2016). Aportes a la biología de *Gymnotus omarorum* (Teleostei) de la Laguna Blanca , Parque Nacional Río Pilcomayo, Formosa: estado de condición, desarrollo gonadal y temporada reproductiva. *Rev. Mus. Argentino Cienc. Nat.*, 18(2), 201–210.
- Juárez-Palacios, J. R. (1989). *Avances en el cultivo de peces del género Colossoma* (Documento de campo No. 5). Brasilia. Retrieved from file:///D:/Bibliografía tesis/AVANCES EN EL CULTIVO DE PECES DEL GENERO Colossoma.html
- Kah, O., Anglade, I., Leprêtre, E., Dubourg, P., & Monbrison, D. DE. (1993). The

- reproductive brain in fish. *Fish Physiol Biochem*, (11), 85–98.
- Kavamoto, E. T., Barnabe, V. H., Campos, B. E. S., & Andrade, E. F. T. (1999). Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimbatá, *Prochilodus lineatus* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). *Bol. Inst. Pesca*, 25, 61–66.
- Kirschbaum, F., Leyendecker, U., Nyogen, B., Schulz, C., Weitkamp, H., Didhiou, S., ... Schugaradt, C. (2008). Environmental control of cyclical reproduction of tropical freshwater fish: Evidence from comparative experimental data. *Cybium*, 32(3), 294–296.
- Kirschbaum, F., & Schugaradt, C. (2002). Reproductive strategies and developmental aspects in mormyrid and gymnotiform fishes. *Journal of Physiology Paris*, (96), 557–566. [https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(03\)00011-1](https://doi.org/10.1016/S0928-4257(03)00011-1)
- Kirschbaum, F., & Wieczorek, L. (2002). Entdeckung einer neuen Fortpflanzungs-strategie bei südamerikanischen Messerfischen (Teleostei: Gymnotiformes: Gymnotidae): Maulbrüten bei *Gymnotus carapo*. *Verhalten Der Aquarienfische.*, (2), 99–107.
- Kirschbaum F. y L. Wieczorek. (2002). Discovery of a new reproduction strategy in South American Knifefish (Teleostei:Gymnotiformes: Gymnotidae): Mouthbreeding in *Gymnotus carapo*. *Aquaristik Fachmagazin Und Aquarium Heute*, 34(165:), 72–77.
- Leonardo, A. F. G. (2003). Inducao a maturacao final, ovulacao e fertilizacao do cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum*, em cativeiro.
- Linhart, O., & Billard, R. (1994). Spermiation and sperm quality. *J. Appl. Ichthyol.*, 10, 182–188.
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., & Cerdà, J. (2010). Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 367–389. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.05.022>
- Mancera Rodríguez, N. J., & García, O. R. (2008). Comercio de fauna silvestre en Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomia Medellin*, 61(2), 4618–4645. Retrieved from <http://search.proquest.com/docview/1677555793?accountid=13250>
- Marcel. (1991). CULTIVO DE PECES. VOL II, PARTE IV: In G. Barnabé (Ed.), *Acuicultura* (p. 1100). OMEGA.

- Markham, M. R., McAnelly, M. L., Stoddard, P. K., & Zakon, H. H. (2009). Circadian and social cues regulate ion channel trafficking. *PLoS Biology*, 7(9), 1–14.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000203>
- Matty, A. J. (1985). *Fish endocrinology* (Cornell Un). Croom Helm.
- Maxime, E. L., & Albert, J. S. (2009). A new species of *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae) from the Fitzcarrald Arch of southeastern Peru. *Neotropical Ichthyology*, 7, 579–585. Retrieved from  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1679-62252009000400004&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-62252009000400004&nrm=iso)
- Menin, E. (1989). Anatomia funcional do tubo digestivo de *Gymnotus carapo* Linnaeus, 1758 (Siluriformes, Gymnotoidei, Gymnotidae). *Rev. Ceres*, 36(207), 435–457.
- Ministerio de Agricultura, G. y P. (2012). *Producción del año 2012 de Acuicultura en la República Argentina Producción*. Buenos Aires.
- Ministerio de Agricultura, G. y P. (2010). *Producción por acuicultura en Argentina 2010*. Buenos Aires.
- Ministerio de Gobierno y Reforma del Estado de la Provincia Santa Fe. (2017). *Plan A toda Costa: un plan de desarrollo sustentable para Garay y San Javier*.
- Moller, P., & Fessard, I. A. (n.d.). Electric Fishöts Historu and behavior With a foreword by.
- Mommsen, T. P., & Korsgaard, B. (2008). Vitellogenesis. In M. João Rocha, A. Arukwe, & B. G. Kapoor (Eds.), *Fish reproduction* (pp. 113–169). Science Publishers.
- Moraes, A., & Espinoza, L. (2001). *A captura e a comercializacao de iscas vivas em Corumba, MS. Boletim de Pesquisa*. Retrieved from  
<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/807371>
- Morandini, L., Honji, R. M., Ramallo, M. R., Moreira, R. G., & Pandolfi, M. (2014). The interrenal gland in males of the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*: Relationship with stress and the establishment of social hierarchies. *General and Comparative Endocrinology*, 195, 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.10.009>
- Muñoz Cueto, J. A. (2009). Cerebro y reproducción en peces: bases neurales y neuroendócrinas. In M. A. Carrillo Estévez (Ed.), *La reproducción de los peces:*

*aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura* (pp. 25–96). Madrid: Fundación Observatorio Español de Acuicultura.

- Murgas, L. D. S., Miliorini, A. B., Franciscatto, R. T., & Alexandre Nízio, M. (2004). Viabilidade Espermiática do Sêmen de Piracanjuba ( *Brycon orbignyanus* ) Resfriado a 4°C. *R. Bras. Zootec.*, 33(6), 1361–1365.
- Murgas, L. D. S., Miliorini, A. B., Franciscatto, R. T., & Maria, A. N. (2004). Viabilidade espermiática do sêmen de piracanjuba (*brycon orbignyanus*) resfriado a 4°C. *Revista Brasileira de Zootecnia*. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982004000600001>
- Mylonas, C. C., Fostier, A., & Zanuy, S. (2010). Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 516–534. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.03.007>
- Pankhurst, N. W. (2008). Gonadal steroids: functions and patterns of change. In M. João Rocha, A. Arukwe, & B. G. Kapoor (Eds.), *Fish reproduction* (pp. 67–111). Science Publishers Enfield, NH, USA.
- Panné, H., & Luchini, S. (2008). Panorama actual del comercio internacional de peces ornamentales. *Instituto*, 1–27. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Panorama+actual+del+comercio+internacional+de+peces+ornamentales#0>
- Panné Huidobro, S. (2013). Comercio internacional de organismos acuáticos ornamentales: participación argentina en la importación y exportación 2012-2013, 1–22.
- Panné Huidobro, S. (2017). Producción por Acuicultura en Argentina en el 2016, (Tabla 1), 1–10.
- Peixoto Gervásio, M. S. (2006). Uso e conservação de recursos naturais relacionados com a pesca desportiva e a exploração de iscas vivas no Pantanal Mato-Grossense, Brasil. *Ensaios e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*, 10(1), 181–194. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=26012756016>
- Perea-Ganchou, F., Perdomo-Carrillo, D. A., Corredor-Zambrano, Z., Moreno-Torres, R., Pereira-Morales, M. y, & González-Estopiñán, M. (2017). FACTORES QUE AFECTAN EL DESEMPEÑO REPRODUCTIVO DE TILAPIAS DEL GENERO *Oreochromis* EN LA ZONA BAJA DEL ESTADO TRUJILLO, VENEZUELA. *Revista*

*Científica, FCV-LUZ, XXVII(2)*, 78–86.

- Planas, J. V., Swanson, P., Rocha, M., Arukwe, A., & Kapoor, B. (2008). Physiological function of gonadotropins in fish. In *Fish reproduction* (pp. 37–66).
- Resende, E. K., Pereira, R. A. C., Sório, V. F., & Galvão, E. M. (2006). Biologia da tuvira, *Gymnotus* cf. *carapo* (Pisces, Gymnotidae) no Baixo rio Negro, Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Biologia*, 42. Retrieved from <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/812542/1/BP67.pdf>
- Ringuelet, R. A., Arámburu, R. H., & de Arámburu, A. S. (1967). Los peces argentinos de agua dulce.
- Rotta, M. A. (2004). Aspectos biológicos e reprodutivos para a criação da Tuvira (*Gymnotus* sp) em cativeiro-I. *Embrapa Pantanal*, 30.
- Rotta, M. A., Pedroso, M. F., & Acorci, L. C. (2007). Determinação do sexo da tuvira *Gymnotus* sp. através da imagem de ultra-som. In *1º Congresso Brasileiro de Producao de Peixes Nativos de Água Doce* (p. 7).
- Rottmann, R. W., Shireman, J. V., & Chapman, F. A. (1991). Introduction to Hormone-Induced Spawning of Fish, (421).
- Sampaio Paulino, Michelle & Batista Miliorini, Alessio & Solis-Murgas, Luis & Souza Mendonca de Lima, Fernando & Felizardo, V. (2011). Reproductive performance of pacu, piracanjuba and curimba induced by bussereline extract. *Boletim Do Instituto de Pesca*, (37), 39–45.
- Sato, Y. (1988). *Reprodução induzida do piau-rola (Leporellus vittatus)*. *Coletânea de resumos dos encontros da Associação Mineira de Aqüicultura; 1982-1987*. Brasília.
- Sato, Y. (1999). *Reprodução de peixes da bacia do rio São Francisco: indução e caracterização de padrões*. UFSCar.
- Sato, Y., Cardoso, E. L., Godinho, A. L., & Godinho, H. P. (1996). Hypophysation of the fish *Prochilodus affinis* from the Rio São Francisco basin. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 48(supl. 1), 55–62.
- Sato, Y., Cardoso, E. L., Sallum, W. B., & Godinho, H. P. (1997). Indução experimental do surubim *Pseudoplatystoma corruscans*. In M. O. T. Miranda (Ed.), *Surubim* (pp. 69–79).

Belo Horizonte,; Ibama.

- Sato, Y., Fenerich-Verani, N., & Godinho, H. P. (2003). Reproducao induzida de eixes da bacia do Sao Francisco. In A. . Godinho, H.P. y Godinho (Ed.), *ÁGUAS, PEIXES E PESCADORES DO SÃO FRANCISCO DAS MINAS GERAIS* (p. 468). Belo Horizonte: Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.
- Sato, Y., Fenerich-Verani, N., Verani, J. R., Godinho, H. P., & Sampaio, E. V. (1998). Induced reproduction and reproductive characteristics of *Rhinelepis aspera* Agassiz, 1829 (Osteichthyes: Siluriformes, Loricariidae). *Brazil. Arch. Biol. Techn.*, 4(3), 309–314.
- Sato, Y., Fenerich-Verani, N., Verani, J. R., Godinho, H. P., & VIEIRA, L. J. S. (2000). Reproductive traits of the neotropical anostomid fish *Leporinus elongatus* V., 1849 under hatchery conditions. *Aquaculture Research*, (31), 189–193.
- Schreck, C. B. (2010). Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 549–556.  
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.07.004>
- Schreck, C. B., Contreras-Sanchez, W., & Fitzpatrick, M. S. (2001). Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture*, 197(1–4), 3–24.  
[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00580-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00580-4)
- Shaliutina, A., Dzyuba, B., Hulak, M., Boryshpolets, S., Li, P., & Linhart, O. (2012). Evaluation of spermiation indices with multiple sperm collections in endangered sterlet (*Acipenser ruthenus*). *Reproduction in Domestic Animals*, 47(3), 479–484.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01907.x>
- Silva, A., Quintana, L., Galeano, M., & Errandonea, P. (2003). Biogeography and breeding in Gymnotiformes from Uruguay. *Environmental Biology of Fishes*, 66(4), 329–338.
- Soares de Oliveira, M., Cândido Pereira, R. A., Kawakami de Resende, E., Mayumi Ishikawa, M., Fernandes dos Santos, J., Soares, J., ... da Costa, D. (2004). Avaliação da qualidade de água para manutenção de tuiuiús (*Gymnotus cf. carapo*) em cativeiro, na unidade experimental do Porto da Manga, Corumbá, Pantanal de Mato Grosso Do Sul, Brasil (p. 6).
- Streit-Jr., D., Sirol, R., Ribeiro, R., Moraes, G., Vargas, L., & Watanabe, A. (2008). Qualitative parameters of the piapara semen (*Leporinus elongatus* Valenciennes, 1850).

- Brazilian Journal of Biology*, 68(2), 373–377. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842008000200019>
- Streit Jr, D. P., de Moraes, G. V., Ribeiro, R. P., Sakaguti, E. S., de Souza, E. D., Povh, J. A., & Caçador, W. (2004). Comparação do sêmen de Curimbá (*Prochilodus lineatus*) induzido por extrato de hipófise de frango, coelho ou carpa. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 41(3), 147–153.
- Streit Jr, D. P., Moraes, G. V., RIBEIRO, R. P. R., Caçador, W. C., Sakaguti, E. S., Povh, J. A., & Souza, Ed. (2003). Estudo comparativo da indução hormonal da espermição em piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) com extrato de hipófise de frango, coelho e carpa. *Acta Scientiarum, Animal Sciences*, 25(2), 261–266.
- Trudeau, V. L. (1997). Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *Rev Reprod*, (2), 55–68.
- Ushizima, T. T., & Bock, C. L. (2000). *Definição de Características Sexuais Secundárias em Gymnotus aff. Carapo (Teleostei, Gymnotidae). Influência da Indução Hormonal como Técnica de Propagação Artificial*. Pirassununga: Universidade de São Paulo, Pirassununga.
- Valdebenito, I. (2008). Terapias hormonales utilizadas en el control artificial de la madurez sexual en peces de cultivo : una revisión Hormone therapy for the artificial control of sexual maturity in fish culture : a review. *Zoological Science*, 123, 115–123. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2008000200002>
- Vazzoler, A.E.A. de M. & Agostinho, A. A. (1991). *Uma nova abordagem da relação gonadossomática aplicada a teleósteos do alto rio Paraná. Encontro Brasileiro de Ictiologia*, 9 (Vol. Resúmenes). Maringá/PR.
- Vazzoler, A.E.A.de M. Rossi-Wongtschowski, C. L. D. B. (1976). *Sardinella brasiliensis*: tipo de desova, fecundidade e potencial reprodutivo relativo. I. Área entre 23o40'S e 24o20'S, Brasil. *Bolm Inst. Oceanogr.*, (25), 131–155.
- Vazzoler, A. E. A. M. (1996). *Biologia da Reprodução de Peixes Teleosteos: Teoria e Prática. EDUEM: Maringá*.
- Vigliano, F., Alemañ, N., Quiroga, M., & M Nieto, J. (2006). *Ultrastructural Characterization of Gills in Juveniles of the Argentinian Silverside, Odontesthes*

*bonariensis* (Valenciennes, 1835) (Teleostei: Atheriniformes). *Anatomia, histologia, embryologia* (Vol. 35). <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2005.00640.x>

Woynarovich, & Hórvath. (1980). *The artificial propagation of warm-water finfishes. A manual for extension*. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/005/AC742E/AC742E00.HTM>

Zanuy, S., Carrillo, M., Rocha, A., & Molés, G. (2009). Regulación y control hormonal del proceso reproductor de los teleósteos. In M. A. Carrillo Estevez (Ed.), *La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura* (pp. 97–172). Madrid: Fundación Observatorio Español de Acuicultura.

Zohar, Y., & Mylonas, C. C. (2001). Endocrine manipulation of spawning induction in cultured fish from hormone to gene. *Aquaculture International*, 197, 99–136.