



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



INDUCCIÓN A LA OVULACIÓN Y
ESPERMIOGÉNESIS EN EL HUACHINANGO DEL
PACÍFICO *Lutjanus peru* (NICHOLS Y MURPHY,
1922) Y ALMACENAMIENTO DE SU SEMEN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN
MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA

VLADIMIR TONATIUH PELCASTRE CAMPOS

LA PAZ, B.C.S., SEPTIEMBRE DE 2006



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 11:00 horas del día 29 del mes de Agosto del 2006 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

"INDUCCIÓN A LA OVULACIÓN Y ESPERMIOGÉNESIS EN EL HUACHINANGO DEL PACÍFICO
***Lutjanus peru* (NICHOLS Y MURPHY, 1922) Y ALMACENAMIENTO DE SU SEMEN"**

Presentada por el alumno:

PELCASTRE

Apellido paterno

CAMPOS

materno

VLADIMIR TONATIUH

nombre(s)

Con registro:

B	0	4	1	2	0	1
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director de tesis
PRIMER VOCAL

DRA. SILVIE DUMAS

PRESIDENTE

DR. JUAN FÉLIX ELORDUY GARAY

SECRETARIO

DR. JESÚS IVÁN MURILLO ÁLVAREZ

SEGUNDO VOCAL

DRA. ARACELI ÁVILÉS QUEVEDO

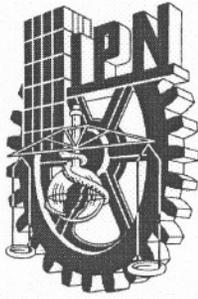
TERCER VOCAL

DRA. CELIA VÁZQUEZ OVANDO

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE N.
CICIMAR
DIRECCION





**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 29 del mes Agosto del año 2006, el (la) que suscribe VLADIMIR TONATIUH PELCASTRE CAMPOS alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS con número de registro B041201 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de: DRA. SILVIE DUMAS y cede los derechos del trabajo titulado: "INDUCCIÓN A LA OVULACIÓN Y ESPERMIOGÉNESIS EN EL HUACHINANGO DEL PACÍFICO
Lutjanus peru (NICHOLS Y MUYRPHY, 1922) Y ALMACENAMIENTO DE SU SEMEN" al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: vpelcastre@ipn.mx silviedumas@hotmail.com

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

VLADIMIR TONATIUH PELCASTRE CAMPOS

nombre y firma

RECONOCIMIENTO

El presente trabajo de investigación se desarrollo bajo el financiamiento de los proyectos SAGARPA-CONACYT: “Cultivo del huachinango *Lutjanus peru*: inducción al desove y condiciones ambientales en la primera alimentación de las larvas” con numero de registro Clave: 2002 C01-378, y al Proyecto Institucional SIP del IPN: “Evaluación de la calidad del semen de huachinango *Lutjanus peru* conservado por refrigeración o criopreservación” con numero de registro 200660372.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional y al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas por la invaluable formación profesional y personal recibida en sus aulas.

A la becas de Posgrado y del Programa de Formación de Investigadores del Instituto Politécnico Nacional que apoyaron mis estudios de posgrado.

A la Dra. Silvie Dumas, directora de este trabajo y líder de nuestro grupo de trabajo.

Al comité revisor de este trabajo: Dr. Juan F. Elorduy Garay, Dr. Jesus Ivan Murillo Álvarez, Dra. Araceli Avilés Quevedo y Dra. Celia Vázquez Ovando por sus atinadas revisiones.

A la M. en C. Dora Esther Hernández Ceballos por su apoyo brindado durante el proceso de ingreso al posgrado en este centro.

Al personal y alumnos de la Unidad Piloto de Maricultivos del CICIMAR: M. en C. Dora Esther Hernández Ceballos, M. en C. Mauricio Contreras, Dr. Renato Peña, Biol. Laura Flores, Biol. Iram Zavala y Biol. Mar. Lucia Corral por su apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

Al personal de apoyo técnico del CICIMAR: Martín Cuevas, Ciro Arista, Alfredo Miramontés, Manuel Zamarrón y Efraín Flores. Nuestras manos derechas en el campo.

Finalmente a todos los amigos y amigas que de alguna manera contribuyeron en el desarrollo de este trabajo.

INDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
RELACION DE TABLAS	8
RELACION DE FIGURAS	9
ABREVIATURAS.	12
GLOSARIO	13
I. INTRODUCCIÓN	16
II. ANTECEDENTES	18
II.1. Reproducción de peces teleósteos.	18
El eje Cerebro-Hipófisis-Gónada.	18
II.2. Gametogénesis.	20
Oogénesis.	20
Espermatogénesis.	24
II.3. Biotecnologías aplicadas a la acuicultura.	26
Manipulación hormonal.	26
Almacenamiento de semen.	28
Refrigeración.	29
Crioconservación.	30
II.4. Descripción de la especie.	33
III. JUSTIFICACIÓN	36
IV. OBJETIVOS	38
V. HIPÓTESIS	38
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	39
VI.1. Captura de reproductores.	39
VI.2. Evaluación de los gametos.	40
Machos.	41
Hembras.	42
VI.3. Inducción hormonal.	42
Machos.	42
Hembras.	43

VI.4. Almacenamiento de semen.	43
Refrigeración.	44
Crioconservación en nitrógeno líquido.	45
VI.5. Análisis histológico.	47
VI.6. Análisis estadísticos.	47
VI. RESULTADOS	49
VI.1. Inducción hormonal.	49
Hembras.	49
Machos.	50
VI.2. Almacenamiento de Semen.	53
Refrigeración.	53
Crioconservación en nitrógeno líquido.	56
VI.7. Análisis histológico.	56
VII. DISCUSIÓN	64
VII.1. Inducción a la maduración final y ovulación.	64
VII.2. Inducción a la espermiogénesis.	67
VII.3. Almacenamiento de semen.	71
Refrigeración	71
Crioconservación	74
VIII. CONCLUSIONES.	78
IX. RECOMENDACIONES	79
X. LITERATURA CITADA	81
XI. ANEXO.	92

RESUMEN.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la LHRHa para la ovulación en hembras y la espermiogénesis en machos de *L. peru*, así como desarrollar técnicas de almacenamiento de semen. Para la inducción con LHRHa en hembras, se utilizaron organismos maduros silvestres con diámetro promedio de oocitos de 0.40 mm. La inducción se realizó mediante dos inyecciones de LHRHa en dosis de 25 µg/kg, 50 µg/kg y 100 µg/kg. Se evaluó el número de desoves, el tiempo desde la primera inyección hasta el desove y la fecundidad relativa por desove. En los machos, la inducción se realizó con una sola inyección de LHRHa en dosis de 25 µg/kg y 50 µg/kg. Se evaluó el volumen de semen, la motilidad espermática, la viabilidad espermática, la concentración celular y el espermatozooto a las 30 horas y las 56 horas después de la inducción (DPI). Los huevos y el semen fueron recolectados por presión abdominal. No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las dosis al registrar el tiempo para obtener el desove (47.4 ± 4.5 h) o la fecundidad relativa (4.34×10^4 huevos por kilogramo). En los machos, no se observaron diferencias significativas entre dosis ($p > 0.05$) al determinar el volumen del semen (3.05 ± 0.48 mL), la concentración celular (4.8×10^9 células/mL), el espermatozooto (16.8%) y la viabilidad celular (259 ± 112 s). Sí se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la motilidad celular de la dosis de 25 µg/kg a las 56h DPI ($47.7 \pm 29.5\%$) siendo inferior a las demás (90%). El almacenamiento de semen se llevó a cabo con muestras de semen fresco diluidas en solución salina de Hank sin calcio 200 µOsm (HBSS) o leche entera en polvo al 10%. El control consistió en semen fresco refrigerado sin diluir. La refrigeración fue realizada a 4 °C. Se evaluó la motilidad a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h. También se utilizó penprocilina como antibiótico (5000 U y 200 U). El semen con solución HBSS sin antibióticos obtuvo el mejor registro de motilidad a las 24 h, 48 h y 72 h ($\approx 80\%$). El control y las demás mezclas con antibióticos generalmente disminuyeron su motilidad después de 48 horas. La crioconservación se realizó a -196 °C en vapores de nitrógeno líquido (NL) con diferentes tiempos de congelamiento de 5, 10 y 15 min. Los diluyentes utilizados fueron: solución salina de Hank sin calcio 200 µOsm (HBSS) y leche entera en polvo al 10%. Los crioprotectores fueron dimetil-sulfóxido (DMSO) (5%, 10%, 15%) y glicerol (5%, 10%, 15%). El semen crioconservado fue descongelado a 25 °C y 30 °C e inmediatamente después la motilidad fue evaluada. Las pruebas de toxicidad mostraron disminución de motilidad después de 20 min en todas las mezclas. Al final, las mezclas de HBSS con DMSO (5% y 10%) y HBSS con glicerol (5% y 10%) se utilizaron para las pruebas de crioconservación. En estas pruebas, la mezcla de HBSS con DMSO 10% obtuvo el mejor registro de motilidad ($\approx 25\%$) al utilizar 10 min de congelamiento por lo que se utilizó para la crioconservación a largo plazo. Después de 10 meses de almacenaje, no se encontraron diferencias significativas al descongelar las muestras a 25 °C ó 30 °C con motilidad de 17%. Se concluye que la dosis de 25 µg/kg de LHRHa debe usarse para inducir la ovulación en hembras y la espermiogénesis en machos. El semen de huachinango puede ser refrigerado por 72 horas en solución HBSS (200 µOsm) y crioconservado por 10 meses con HBSS y DMSO 10% siguiendo el método aquí reportado.

ABSTRACT.

The objective of this study was to evaluate the effect of LHRHa on spawning success in *L. peru* females and males and to develop a storage semen method. The hormonal induction in females was achieved with wild mature organisms with average oocyte diameter of ~0.40 mm. Doses of 25 µg/kg, 50 µg/kg and, 100 µg/kg were used. They were applied in two injections. We evaluated the spawning success, the time between the first injections and spawning, and the relative fecundity per spawning. Males were induced with a single injection of LHRHa in doses of 50 µg/kg and 25 µg/kg. We evaluated the sperm volume, spermatic motility, cell viability, cell concentration, and spermatocrit at 30 hours and 56 hours after induction (DPI). The eggs and semen were obtained by abdominal stripping. There was no significant difference between doses ($p>0.05$) for the spawning time (47.4 ± 4.5 h.) and the relative fecundity (4.34×10^4 eggs/kg). In males, there was no significant difference between doses ($p>0.05$) for the volume of semen (3.05 ± 0.48 mL), cell concentration (4.8×10^9 cell/mL), spermatocrit (16.8 %), and cell viability (259 ± 112 seg). There was a significant difference ($p<0.05$) for cell motility with the 25 µg/kg doses at 56h DPI (47.7 ± 29.5 %) which was lower than other (90%). Refrigeration storage of semen was conducted with fresh semen resuspended in Hank's balanced salt solution without calcium 200 µOsm (HBSS) (1:10 V/V) or whole powder milk 10%. The control consisted of refrigerated fresh semen. The refrigeration was done at 4 °C. Motility was evaluated after 24 h, 48 h, 72 h and 96 h. The antibiotic Penprocillin (5000 U or 200 U) was used. The solution HBSS without antibiotics showed the highest motility after 24 h, 48 h and 72 h ($\approx 80\%$). The control and the other treatments showed a decreased motility after 48 hours. Cryopreservation of semen was achieved at -196 °C in liquid nitrogen (NL) vapors at different freezing times: 5, 10, and 15 min. Extenders and cryoprotectant toxicity were previously evaluated. The extenders used were: HBSS and whole powdered milk 10%. The cryoprotectants were dimetil-sulfoxide (DMSO) (5%, 10%, 15%) y glycerol (5%, 10%, 15%). Motility was evaluated after 20, 40, 60 y 80 minutos. The toxicity tests showed diminution of motility after 20 min in all mixtures. HBSS with DMSO (5% and 10%) and HBSS with glycerol (5% and 10%) were used for the preliminary cryopreservation tests. Sperm was defrosted at 25 °C. In these tests HBSS with DMSO 10% showed the higher motility ($\approx 25\%$) when freeze for 10 min. This mixture and freezing time were used for the long term cryopreservation. In these experiments, sperm was defrosted at 25 °C and also, at 30 °C After 10 months of storage, there was no significant difference between the defrosting temperatures (25 °C and 30 °C) (average motility of 17%). We conclude that LHRHa at 25 µg/kg can be used to induce ovulation in females and spermiogenesis in males. Sperm can be refrigerated for 72 hours when extended with HBSS (200 µOsm) and cryopreserved for 10 months in HBSS y DMSO 10% following the described method.

RELACION DE TABLAS.

Tabla 1. Clasificación taxonómica del huachinango del Pacífico <i>Lutjanus peru</i> .	Pág. 34.
Tabla 2. Mezclas de soluciones diluyentes y antibiótico utilizadas para la refrigeración de semen de <i>Lutjanus peru</i> a 4 °C.	Pág. 44.
Tabla 3. Mezclas de diluyentes y crioconservadores celulares utilizados para la prueba de toxicidad en semen de <i>Lutjanus peru</i> .	Pág. 45.
Tabla 4. Peso promedio de las hembras, diámetro promedio de los oocitos antes de la inducción (\emptyset), tiempo transcurrido entre la primera inyección y el desove (T) y fecundidad relativa promedio (FR) en hembras de <i>Lutjanus peru</i> tratadas con LHRHa en dosis de 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$.	Pág. 49.
Tabla 5. Caracterización cualitativa y volumen de semen obtenido a las 30 horas y las 56 horas después de la inducción con dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LHRHa en machos de <i>Lutjanus peru</i> .	Pág. 51.

RELACION DE FIGURAS.

- Figura 1 Eje Cerebro-Hipófisis-Gónada. (+ Señal de estímulo, - señal de inhibición). Pág. 19.
- Figura 2. Representación de la oogénesis en hembras de peces teleósteos. (Modificado de Anónimo 2003) Pág. 22.
- Figura 3 Representación de la espermatogénesis. (Modificado de Marieb, 1999). Pág. 25.
- Figura 4. Huachinango del Pacífico *Lutjanus peru* (Nichols y Murphy, 1922). Pág. 33.
- Figura 5. Número de células espermáticas por mililitro obtenidas en semen de *Lutjanus peru*. Las muestras se obtuvieron a las 30 horas y las 56 horas después de la inducción (DPI) con dosis de 25 µg/kg y 50 µg/kg de LHRHa. Las letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($p>0.05$) entre el número de células/mL de cada tratamiento. Barras formadas con valores promedio más o menos error estándar. Pág. 52.
- Figura 6. Valores de espermatocrito (%) obtenidos en semen de *Lutjanus peru*. Las muestras se obtuvieron a las 30 horas y las 56 horas después de la inducción (DPI) con 25 µg/kg o 50 µg/kg de LHRHa. Las letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($p>0.05$) entre el espermatocrito de cada tratamiento. Barras formadas con valores promedio más o menos error estándar. Pág. 52.
- Figura 7. Motilidad de las células espermáticas de *Lutjanus peru*. Las muestras se obtuvieron a las 30 horas y las 56 horas después de la inducción (DPI) con 25 µg/kg o 50 µg/kg de LHRHa. Las letras diferentes indican que hay diferencia significativa ($p<0.05$) entre los tratamientos. Barras formadas con valores promedio más o menos error estándar. Pág. 53.
- Figura 8. Porcentaje de células espermáticas viables de *Lutjanus peru*. Las muestras se obtuvieron a las 30 horas y las 56 horas después de la inducción (DPI) con 25 µg/kg o 50 µg/kg de LHRHa. Curvas formadas con valores promedio más o menos error estándar. Pág. 54.

- Figura 9. Motilidad (%) de las células espermáticas de *Lutjanus peru*. La activación celular se realizó después de 24, 48, 72 y 96 horas de refrigeración. A) Dosis de penprocilina de 5000 U y B) dosis de penprocilina de 200 U. Las letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos para cada tiempo de registro. Curvas formadas con valores promedio más o menos error estándar. Pag. 55.
- Figura 10. Prueba de toxicidad. Motilidad (%) de las células espermáticas de *Lutjanus peru* después de haber sido diluido con HBSS o leche en combinación con DMSO o glicerol. Las letras en las curvas indican igualdad estadísticamente significativa ($p < 0.05$) para cada tiempo de registro. Curvas formadas con valores promedio más o menos error estándar. Pág. 57.
- Figura 11. Motilidad de las células espermáticas de *Lutjanus peru* después de haber sido congeladas en nitrógeno líquido con diferentes diluyentes y crioprotectores. El congelamiento se realizó en vapores de nitrógeno líquido con diferentes tiempos de exposición (5, 10 y 15 minutos). Las letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$). Barras formadas con valores promedio más o menos error estándar. Pág. 58.
- Figura 12. Motilidad de las células espermáticas de *Lutjanus peru* después de haber estar congeladas en nitrógeno líquido con la solución HBSS y DMSO al 10% durante 8 meses. El congelamiento se realizó en vapores de nitrógeno líquido con tiempo de exposición de 10 minutos. Se utilizaron dos temperaturas de descongelamiento 25 °C y 30 °C. Las letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los tratamientos. Barras formadas con valores promedio más o menos error estándar. Pág. 57.
- Figura 13. Micrografía de gónada de hembras de *Lutjanus peru* obtenidas en la cuarta semana de muestreo. Se observan varios oocitos en vitelogénesis avanzada (Vg), gránulos de vitelo (Vit) en el citoplasma de los oocitos, capa de células foliculares (Fol). Oocitos perinucleolares (Pn). Vista con aumento de 200X. Técnica de tinción hematoxilina-eosina. Pág. 61.

Figura 14. Micrografía de testículo de machos de *Lutjanus peru* obtenido en la sexta semana de muestreo. Se observan algunas zonas con epitelio germinativo (Epi), zonas con espermatocitos (Ec), Espermatidas (Em) y ductos espermáticos (D) con espermatozoides (Ez). Vista con aumento de 400X. Técnica de tinción hematoxilina-eosina.

Pág. 62.

Figura 15. Micrografía de testículo de machos de *Lutjanus peru*. Estas muestras pertenecen a las gónadas utilizadas para la crioconservación. Se observan zonas con espermatocitos (Ec). El lumen de los conductos espermáticos (L) se observa lleno de espermatozoides (Ez). Vista con aumento de 400X. Técnica de tinción hematoxilina-eosina.

Pág. 63.

ABREVIATURAS.

11-KT:	once cetotestosterona.
17 α -20 β -DP:	diecisiete alfa, veinte beta, dihidroxi progesterona.
17 α -HP:	diecisiete alfa hidroxiprogesteroa.
20 β -S	diecisiete alfa, veinte beta, dihidroxi progesterona.
DMSO:	dimetil-sulfóxido.
E ₂ :	estradiol.
Estradiol-17 β :	estradiol diecisiete beta.
GnRH:	factor liberador de hormonas gonadotropinas.
GtH:	hormona gonadotropina.
FSH:	hormona folículo estimulante.
LH:	hormona luteinizante.
HBSS:	solución salina balanceada de Hank.
MPF:	factor promotor de la maduración.
NL:	nitrógeno líquido.
μ g/kg:	microgramo por kilogramo.
μ L:	microlitro.
μ m:	micrómetro.
μ Osm:	microosmolaridad.
cm:	centímetro.
g/L:	gramo por litro.
g:	gramo
h:	hora.
kg:	kilogramo
min:	minutos.
mL:	mililitros.
mm:	milímetro.
s:	segundo.
U:	unidad.

GLOSARIO.

Crioconservación de gametos: Proceso de almacenamiento de semen u oocitos a temperaturas de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. A temperaturas por debajo de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ la célula se congela, el metabolismo celular cesa y la célula puede ser mantenida en congelación por tiempo indefinido (Stoss, 1983).

Espermátida: Estadio intermedio de formación de las células sexuales masculinas.

Espermatogénesis: Proceso de formación de las células gaméticas masculinas dentro de los testículos, a partir de la división celular de las espermatogonias (Schulz y Miura, 2002).

Espermatogonia: Célula germinal primordial productora de espermatozoides después de una serie de divisiones celulares (Nagahama, 1983).

Espermatozoide: Célula sexual masculina (Nagahama, 1983).

Espermiación: Proceso de liberación de los espermatozoides ya formados hacia los conductos eferentes (Schulz y Miura, 2002).

Espermiogénesis. Proceso de transformación de las espermátidas en espermatozoides (Schulz y Miura, 2002).

Factor liberador de la hormona luteinizante: Es un decapeptido proveniente del hipotálamo, implicado en la estimulación de la síntesis y secreción de las dos gonadotropinas hipofisíarias FSH y LH (Millar *et al.*, 2004)

Gameto: Célula sexual masculina (espermatozoide) o femenina (óvulo) (Webster y Webster, 1974).

Gónada: Órgano sexual primario del que se originan las células germinales (Webster y Webster, 1974).

Hipófisis: Glándula endocrina responsable de la secreción de varios tipos de hormonas. Se divide en dos secciones: un lóbulo anterior o adenohipófisis y otro lóbulo posterior o neurohipófisis (Matty, 1985).

Hipotálamo: Forma la base del cerebro en la región del diencefalo, una subdivisión del cerebro anterior. El hipotálamo es responsable de la síntesis y secreción de los factores liberadores de hormonas gonadotrópicas importantes en la reproducción.

Hormona folículo estimulante (FSH): Hormona de origen glucoprotéico sintetizada en la hipófisis, responsable de la gametogénesis en etapas tempranas de desarrollo (Swanson *et al.*, 2003).

Hormona luteinizante (LH): Hormona de origen glucoprotéico sintetizada en la hipófisis, responsable de la síntesis de los esteroides gonadales implicados en la ovulación y espermiogénesis (Swanson *et al.*, 2003).

Oocito: Célula sexual femenina también conocida como ovocito (Grier y Lo Nostro, 2000).

Oogénesis: Proceso de formación de las células gaméticas femeninas dentro del ovario (Patiño y Sullivan, 2002).

Oogonía: Célula germinal primordial productora de oocitos (Grier y Lo Nostro, 2000).

Ovulación: Proceso de separación de las células foliculares del oocito, que provoca la liberación del este hacia el lumen del ovario. El proceso es producto de enzimas proteolíticas que actúan a nivel de las células foliculares provocando su contracción (Patiño y Sullivan, 2002).

Quiescente: Que está quieto pudiendo tener movimiento propio.

Refrigeración de gametos: Proceso de almacenamiento de semen u óvulos a bajas temperaturas (1 °C - 10 °C). Temperaturas cercanas al punto de congelación son suficientes para disminuir el metabolismo celular y poder prolongar el tiempo de vida de las células (Stoss, 1983).

Semen: Mezcla de espermatozoides con el fluido seminal (Schulz y Miura, 2002).

Solución crioprotectora: Solución que le confiere resistencia a los espermatozoides al ser congelados. Tiene la capacidad de disminuir el efecto de la alta concentración de sales en el medio, disminuir el efecto por deshidratación (encogimiento celular) y de minimizar la formación de cristales de hielo intracelulares (Suquet *et al.*, 2000).

Solución diluyente: Es un medio isotónico, isosmótico, con capacidad de amortiguar los cambios de pH del medio. Contiene nutrientes, estabilizadores, antioxidantes y, en ocasiones presenta suplementos antibacterianos (Suquet *et al.*, 2000)

Vitelogénesis: Comprende la etapa de desarrollo del oocito donde ocurre la captación de una gran cantidad de proteínas extracelulares, las cuales son procesadas y almacenadas en el citoplasma oocito. En la mayoría de los peces, la principal proteína captada es la vitelogenina, proveniente del hígado (Tyler y Stumpter, 1996).

I. INTRODUCCIÓN.

Los eventos de reproducción en los peces teleósteos están regulados por diversos factores que desencadenan procesos internos en los organismos que culminan con el desarrollo de los gametos, su consecuente expulsión y posterior fertilización (Liley y Stacey, 1983; Tucker, 1998). Estos eventos están adecuados a un tiempo (e. g. periodo del año) y espacio (e. g. condiciones adecuadas para la supervivencia de la progenie) específicos. Algunos factores exógenos que influyen los eventos reproductivos de los peces son: la calidad del agua (oxígeno disuelto, turbidez, pH, salinidad, amonio disuelto), temperatura, fotoperíodo y disponibilidad de alimento; así como también algunos factores endógenos involucrados con el mantenimiento de la gónada, sincronización de desoves, reabsorción de huevos, entre otros (Munro *et al.*, 1990).

En cautiverio, el proceso reproductivo de los peces se modifica debido al encierro. La ausencia de estímulos ambientales ocasiona que los organismos presenten disfunciones reproductivas, y por lo tanto, los fenómenos de reproducción no se lleven a cabo (Matty, 1985). Zohar y Mylonas (2001) consideran tres tipos de disfunciones reproductivas en las hembras mantenidas en cautiverio. El primer tipo ocurre cuando no se completa la vitelogénesis. El segundo tipo se refiere a la incapacidad de completar la maduración final de los oocitos y no ocurre la ovulación. El tercer tipo se presenta cuando no ocurre el desove voluntario al final del ciclo reproductivo aún cuando los oocitos estén hidratados. En los machos, los principales problemas hacen referencia a organismos con nula o poca producción de semen además de asincronía con la época de desove de las hembras. También se habla de la calidad del semen, esto es, el volumen de semen, la fluidez, la concentración de células espermáticas por mililitro, la motilidad del esperma, la viabilidad celular y la capacidad de fertilización (Trippel, 2003).

Una solución muy práctica ante los problemas de disfunción reproductiva ha sido la manipulación del ciclo endocrino-reproductivo, incorporando hormonas

exógenas que induzcan o magnifiquen el proceso hormonal de reproducción, ya sea induciendo el desove en hembras o favoreciendo la producción de semen en machos (Zohar y Mylonas, 2001). Por otro lado, en los machos, el uso de semen almacenado bajo refrigeración o crioconservación también ha resuelto varios problemas de disponibilidad de semen (Suquet *et al.*, 2000).

El huachinango del Pacífico *Lutjanus peru*, al igual que muchas otras especies con potencial de cultivo, presenta disfunciones reproductivas que impiden que se lleve a cabo con éxito la reproducción en cautiverio. La manipulación del fotoperíodo y la temperatura durante su ciclo reproductivo ha permitido que se pueda lograr la maduración gonádica. A pesar de ello, es necesario el uso de hormonas exógenas como la HCG (hormona gonadotrópica humana) para obtener desoves (Dumas *et al.*, 2004). La utilización de otro tipo de inductores hormonales, como el factor liberador de la hormona luteinizante (LHRHa), aún no se ha reportado para esta especie. El considerar su uso beneficiaría la eficacia al inducir desoves y disminuiría costo en comparación con otros métodos de inducción como con el uso de la HCG. Por otro lado, el uso de semen almacenado aún no está disponible para el huachinango. Su uso beneficiaría principalmente en el manejo de reproductores, limitando el manejo solo a las hembras, o en la fecundación, donde se utilizaría semen de la mejor calidad. Además, esta tecnología abre la posibilidad de transportar semen entre laboratorios (Suquet *et al.*, 2000).

El presente trabajo pretende establecer las bases para el uso de la LHRHa como inductor de desoves en el huachinango *L. peru*. Además, pretende desarrollar técnicas de almacenamiento de semen de huachinango a corto y largo plazo. Los resultados que se obtengan de este estudio podrán utilizarse para el desarrollo de protocolos rutinarios de trabajo en un laboratorio de reproducción de peces marinos.

II. ANTECEDENTES.

II.1. Reproducción de peces teleósteos.

La reproducción de los peces es un proceso bastante complejo por la diversidad de elementos que determinan que un organismo se reproduzca. Los eventos reproductivos están sujetos a múltiples estímulos del ambiente y de los propios organismos. La integración de los diversos estímulos se lleva a cabo por el sistema endocrino de los organismos que regula todos los procesos fisiológicos, incluyendo la reproducción. El sistema endocrino se compone de un conjunto de órganos y tejidos que liberan mensajeros químicos denominados hormonas. Las hormonas se encargan de la transmisión de información entre los diferentes órganos y tejidos que integran el sistema endocrino. Los componentes que integran este sistema conforman el denominado eje Cerebro-Hipófisis-Gónada (Figura 1).

El eje Cerebro-Hipófisis-Gónada.

De manera general, el funcionamiento del eje consiste en la recepción del estímulo ambiental por diversos órganos sensores de los peces. Estos estímulos son dirigidos al cerebro que funciona como un centro integrador y transmisor de la información. Dentro del cerebro, la región más importante desde el punto de vista endocrino es el hipotálamo. El hipotálamo conforma la unión entre el sistema nervioso central (principalmente el cerebro) y el sistema endocrino. El hipotálamo es responsable de la síntesis y secreción de los factores liberadores de hormonas gonadotrópicas (GnRH, Gonadotropin Releasing Hormones por sus siglas en inglés).

El hipotálamo se encuentra asociado a la glándula endocrina conocida como hipófisis o glándula pituitaria, responsable de la secreción de varias hormonas reproductivas y no reproductivas. La hipófisis se divide en dos secciones: un lóbulo anterior o adenohipófisis y otro lóbulo posterior o neurohipófisis.

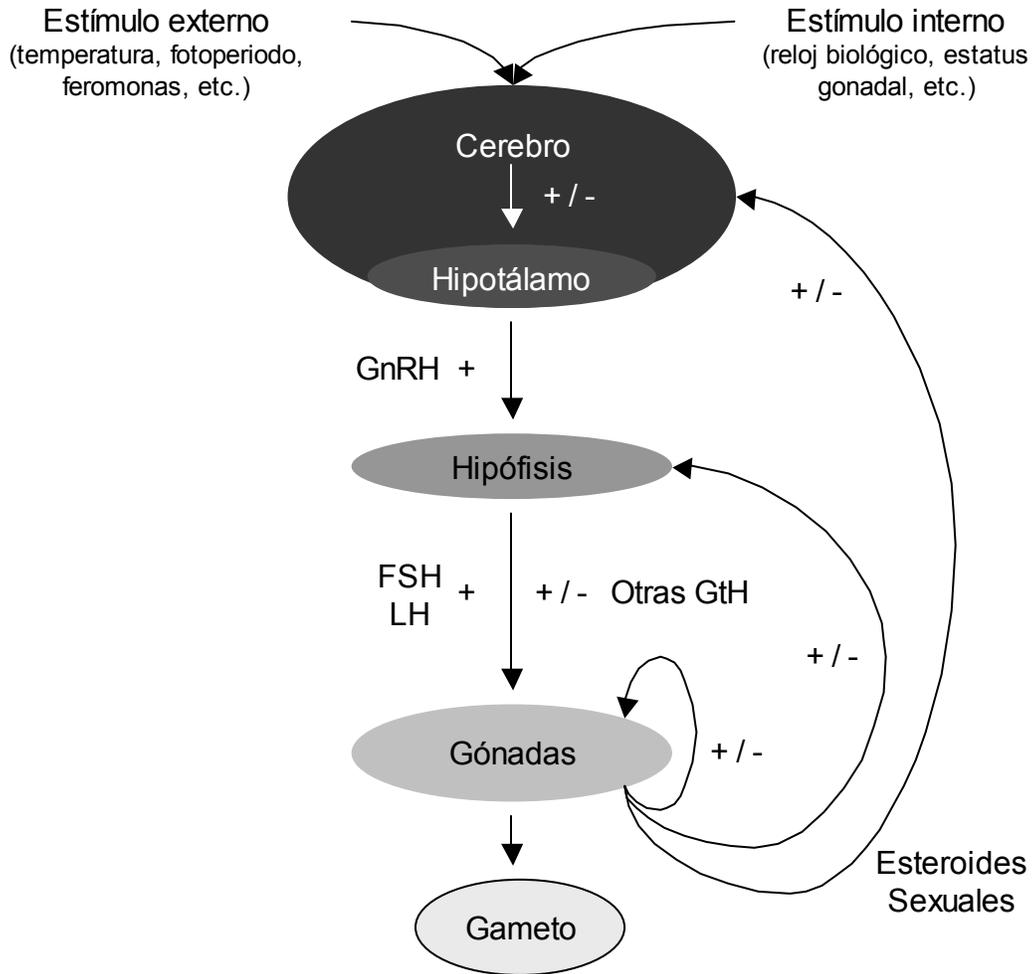


Figura 1 Eje Cerebro-Hipófisis-Gónada. (+ Señal de estímulo, - señal de inhibición).

La neurohipófisis es una prolongación del hipotálamo conformada por axones de células neurosecretoras que transmiten los diferentes factores liberadores provenientes del cerebro. Estos GnRH son liberados en la neurohipófisis y transportados por vasos sanguíneos hacia la adenohipófisis. En la adenohipófisis estimulan la síntesis y secreción de varios tipos de hormonas. De importancia para la reproducción se presentan las hormonas gonadotrópicas o GtH (Gonadotropin Hormones por sus siglas en inglés) producidas por células gonadotróficas de la adenohipófisis. En los vertebrados se han identificado dos tipos de GtH que se

involucran en la gametogénesis: la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) (Nagahama, 1983). Ambas GtH viajan por el torrente sanguíneo hasta las gónadas (ovarios y testículos). El efecto de las GtH en las gónadas se ve culminado con la síntesis de esteroides sexuales responsables de la maduración de los gametos completando así la ruta hormonal necesaria para la formación de los gametos.

II.2. Gametogénesis.

Oogénesis.

La oogénesis es el proceso de formación de las células gaméticas femeninas dentro del ovario. En un principio, el ovario inmaduro está compuesto sólo por epitelio germinativo. A partir de este epitelio germinativo se originan los folículos ováricos que a su vez están constituidos por las oogonias y las células somáticas. Al iniciar la madurez sexual de los organismos, el proceso de oogénesis también inicia al registrarse una serie de divisiones celulares de las oogonias y el crecimiento de las células gaméticas. De manera general la oogénesis se divide en cuatro fases (Figura 2).

- 1) Crecimiento primario del oocito. Se caracteriza por la división mitótica de las oogonias o proliferación mitótica. También se inicia la división meiótica de las oogonias quedando interrumpida hasta metafase 1. A nivel estructural ocurre la formación de una capa de células foliculares alrededor del oocito y la orientación de los nucleolos a la periferia del núcleo.
- 2) Crecimiento secundario del oocito. Durante esta etapa inicia el crecimiento del oocito por la incorporación de nutrientes que funcionarán como reserva nutricia durante la embriogénesis. Esta etapa se divide en dos: previtelogénesis y vitelogénesis.

Previtelogénesis: comprende la formación de gotas de lípidos dentro del citoplasma, la formación de los alvéolos corticales (glucoproteínas) y la

diferenciación de las células foliculares en células de la teca y de la granulosa.

Vitelogénesis: corresponde al evento de desarrollo del oocito donde ocurre un gran incremento en el tamaño de este debido a la captación de material de reserva que conformara la principal reserva nutricia del oocito durante la embriogénesis (Wallace y Sellman, 1981; Idler y Ng, 1983). El principal elemento de reserva captado por el oocito es una proteína de origen hepático conocida como vitelogenina, la cual tras su incorporación por micropinocitosis al oocito, sufre proteólisis para incorporarse a los gránulos de vitelo. En esta fase también ocurre la formación del corion debajo de la capa de células granulosa (Patiño y Sullivan, 2002).

El proceso hormonal durante estas etapas consiste en la liberación de la LHRH por el hipotálamo. Esto estimula la síntesis y secreción de la LH y FSH por parte de la hipófisis. En peces, tanto la LH como la FSH provocan la producción de estradiol-17 β en las células foliculares a partir de la testosterona (Patiño y Sullivan, 2002), aunque la LH ha mostrado más relación al estimular la síntesis de estradiol-17 β (Swanson *et al.*, 2003). El estradiol-17 β es liberado al sistema circulatorio para llegar al hígado donde estimula la síntesis y secreción de vitelogenina (Idler y Ng, 1983). La vitelogenina viaja por el sistema circulatorio hacia las gónadas para incorporarse al oocito. La incorporación ocurre por procesos de pinocitosis de las células foliculares y las microvellosidades conectadas al corion del oocito (Patiño y Sullivan, 2002).

- 3) Maduración Final. En esta etapa de desarrollo ocurre la maduración citoplásmica del oocito. Se reactiva la meiosis detenida hasta metafase 1. Ocurre la fusión de los gránulos de vitelo, las gotas de lípido sufren licuefacción y el núcleo empieza su migración hacia el polo animal. Desaparece la membrana nuclear y la vesícula germinal ya se encuentra en el polo animal. Posteriormente ocurre la hidratación del oocito. El

citoplasma se clarifica y el tamaño del oocito se incrementa. En algunas especies se forman una o varias gotas de aceite. También se libera el primer cuerpo polar.

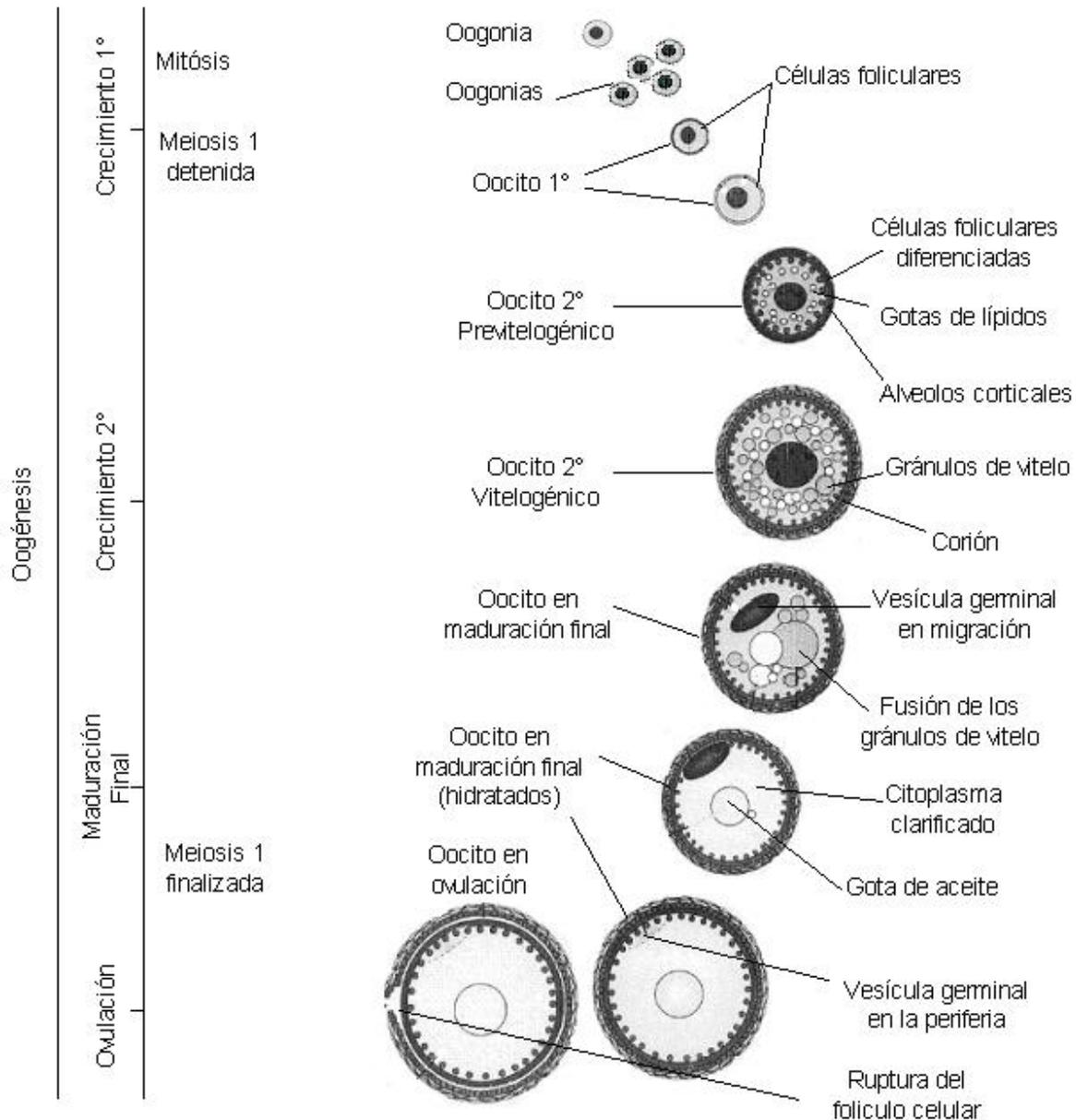


Figura 2. Representación de la ovogénesis en hembras de peces teleósteos. (Modificado de Anónimo 2003).

El proceso de reactivación de la división celular es provocado por un factor promotor de la maduración o MPF (Maturation Promotor Factor por sus siglas en inglés) (Nagahama, 2000). El MPF está conformado por dos subunidades protéicas, una con actividad catalítica (cdc2-quinasa) y otra con capacidad reguladora (ciclina-B). Se forman a partir del estradiol-17 β transformado a 17 α -20 β -DP por las células foliculares. El 17 α -20 β -DP actúa a nivel de las células foliculares provocando la síntesis de la ciclina-B y su unión con la cdc2-quinasa que se encuentra en el citoplasma (Nagahama, 2000). Después de la reactivación de la división celular, el MPF se vuelve inactivo.

- 4) Ovulación. La última etapa consiste en la expulsión del oocito hacia el lumen del ovario. En esta fase, las células foliculares se separan de la membrana coriónica del oocito, ocurre una ruptura de las células foliculares, éstas se contraen y expulsan al oocito. El proceso está mediado por la LH que estimulan la síntesis de esteroides sexuales como en la maduración. Su efecto se observa en la degradación y ruptura de la capa de células foliculares, aunque este proceso aún no está bien entendido (Patiño y Sullivan, 2002). Otra hormona que actúa en la ovulación es la prostaglandina (PG) secretada por el folículo ovárico, que estimula el proceso de contracción folicular (Donaldson y Hunter, 1983).

Se reconocen tres tipos de desarrollo ovárico: a) Sincrónico, todos los oocitos tienen el mismo estado de desarrollo y es característico de peces que ponen sólo una vez y mueren. b) Sincrónico por grupos, presenta al menos dos poblaciones de oocitos en diferente estado de desarrollo, es característico de peces con una puesta anual y estación reproductiva relativamente corta. c) Asincrónico, que contiene oocitos en todos los estados de desarrollo. Es característico de especies con desoves múltiples y una estación reproductiva larga (Wallace y Selman, 1981).

Espermatogénesis.

La espermatogénesis es el proceso de formación de las células gaméticas masculinas dentro de los testículos. Los testículos son estructuras lobulares o tubulares, según la especie, conformadas por dos tipos de células. Las células de Leydig ubicadas en la periferia de los túbulos y las células de Sertoli ubicadas dentro de los túbulos seminíferos. Las células de Sertoli funcionan como soporte de las células germinales o espermatogonias, la unidad funcional de estas células es conocida como espermatocisto o cisto espermático (Grier y Lo Nostro, 2000; Schulz y Miura, 2002). La espermatogénesis se divide en tres fases de desarrollo (Figura 3).

- 1) Proliferación mitótica de espermatogonias. En esta fase la célula espermatogonial entra en una serie de divisiones celulares para aumentar su número (Schulz y Miura, 2002). En principio, las divisiones celulares se presume estén reguladas por estrógenos (E_2) aunque el proceso no es aun bien conocido (Miura *et al.*, 1999).
- 2) Proliferación meiótica de espermatocitos. El proceso de división celular en las espermatogonias cambia de mitosis a meiosis (Schulz y Miura, 2002). En la meiosis 1 se generan los espermatocitos. Los espermatocitos entran en meiosis 2 para la generación de las espermátidas. Durante esta fase de desarrollo, los espermatocitos pierden el 80-90% de su volumen celular. La cromatina se condensa, el núcleoplasma se incorpora al citoplasma y el material celular es fagocitado. Las mitocondrias se concentran en el cuello de la célula y el flagelo crece (Schulz y Miura, 2002). En los peces teleósteos no hay formación de acrosoma como en los mamíferos. Esta fase de desarrollo aún esta regulada principalmente por la FSH, aunque los niveles de LH se incrementan después de la meiosis 2. La FSH estimula la activación de las células de Leydig y de Sertoli hasta ahora inactivas (Schulz y Miura, 2002).

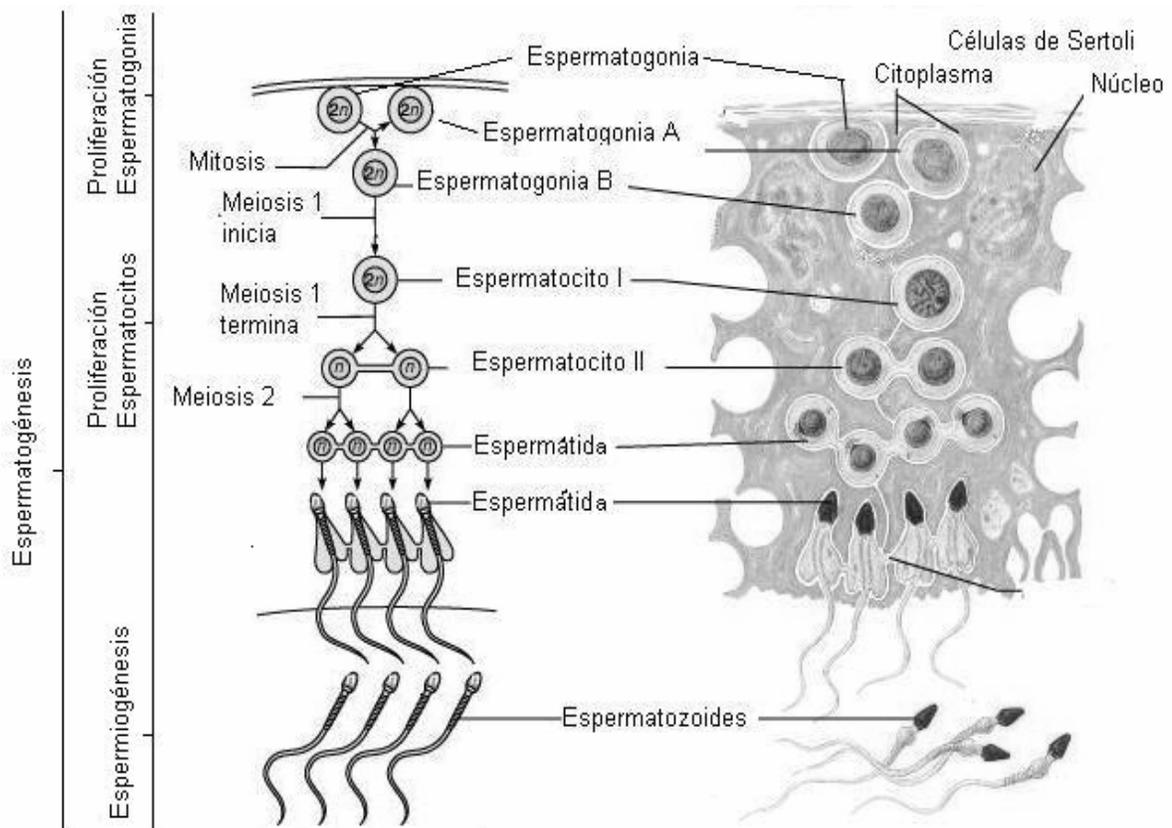


Figura 3 Representación de la espermatogénesis. (Modificado de Marieb, 1999).

La FSH estimula la síntesis del esteroide 11-cetotesterona (11-KT) en los cistos espermáticos (Fostier *et al.*, 1983; Nagahama, 1983). El 11-KT activa a las células de Sertoli para producir la activina B que se presume sea responsable de la activación del proceso de cambio en la división celular de mitosis a meiosis (Nagahama, 2000).

3) Espermiogénesis. Después haberse completado las divisiones celulares, las paredes del cisto espermático se rompen y liberan a los ya formados espermatozoides hacia los conductos eferentes. Este proceso es conocido como espermiación (Schulz y Miura, 2002). A su paso por los conductos, los espermatozoides pasan por un proceso de maduración (adquisición de la

capacidad de movimiento) (Morisawa y Morisawa, 1986) e hidratación (producción de fluido que se mezcla con los espermatozoides para conformar el semen) (Schulz y Miura, 2002). La espermiogénesis está regulada en gran medida por la LH. La LH provoca un cambio en la ruta metabólica de síntesis esteroidal de 11-KT a la síntesis de 17α -HP y su posterior conversión a 17α - 20β -DP (20β -S) llevada a cabo en los espermatozoides. La 20β -S se ha relacionado con el proceso de regulación de espermiogénesis y maduración aunque se desconocen aún sus efectos a nivel celular (Nagahama, 2000; Schulz y Miura, 2002).

II.3. Biotecnologías aplicadas a la acuicultura.

El conocimiento sobre el proceso endocrino implicado en la reproducción ha permitido a los acuicultores el desarrollo de biotecnologías útiles para estimular la maduración de los organismos en cautiverio. La herramienta más sencilla ha sido la inducción ambiental, basada en la manipulación de la temperatura y el fotoperíodo para favorecer la maduración de las gónadas. La otra herramienta consiste en el uso de hormonas que induzcan o magnifiquen el proceso hormonal de reproducción, ya sea induciendo el desove en hembras o favoreciendo la producción de semen en machos. Por otro lado, otro tipo de biotecnologías también utilizadas por los acuicultores, se basa en el almacenamiento de gametos (semen y oocitos) disponibles para cuando el acuicultor los requiera. En este trabajo la discusión se centrará en el uso de hormonas para la inducción y el almacenamiento de gametos, en especial de semen.

Manipulación hormonal.

La utilización de hormonas exógenas para inducir la reproducción en peces en cautiverio no es reciente. El primer registro data de los años treinta y reporta el uso de inyecciones de extractos de glándulas pituitarias obtenidas de otros peces en etapas maduras (Matty, 1985). Esta técnica aún se utiliza debido a que ofrece

resultados aceptables. Su desventaja radica en la inconsistencia de los resultados tras varias aplicaciones y la posibilidad de transmitir alguna enfermedad (Yaron, 1995; Zohar y Mylonas, 2001).

Otra técnica de inducción consiste en extraer y purificar las GtH de otros vertebrados y aplicarlas a los peces. Las GtH son glucoproteínas heterodiméricas. En cada heterodímero hay dos cadenas polipeptídicas denominadas subunidades α y β (Moyle *et al.*, 1994). La subunidad α es homóloga para la mayoría de las GtH de los vertebrados, mientras que la subunidad β es más específica de la especie. De acuerdo a esta similitud estructural, las GtH se pueden utilizar entre especies y ofrecer el mismo resultado.

Las GtH son hormonas muy efectivas. Su principal ventaja se basa en su rapidez de acción, actuando directamente sobre las gónadas (Zohar y Mylonas, 2001). Presenta un gran tiempo de residencia en el sistema circulatorio (horas) permitiendo un efecto más prolongado (Swanson *et al.*, 2003). Sin embargo, su desventaja se presenta en la generación de algún tipo de respuesta inmune después de continuas aplicaciones, ocasionando que la efectividad se pierda (Zohar *et al.*, 1989).

Los últimos métodos de inducción hormonal se basan en la aplicación de GnRH de tipo análogos. Éstas son copias sintéticas de las GnRH naturales por lo que se conocen como GnRHa. La ventaja de la GnRHa es que no genera una respuesta inmune, interviene en el sistema endocrino desde un nivel superior provocando que la respuesta de estimulación sea más balanceada (Donaldson y Hunter, 1983). Se incrementa el tiempo de residencia en el organismo en comparación con las GnRH naturales (de minutos a horas) ya que al modificar su estructura molecular se hace resistente a la degradación enzimática por parte de endopeptidasas de la hipófisis, hígado y riñón, además de que su afinidad a los receptores de la glándula pituitaria se incrementa aumentando también su poder de acción entre 30 y 50 veces (Zohar y Mylonas, 2001).

El uso de las GnRHa se ha incrementado en los últimos años. Los protocolos de inducción al desove, a través de la utilización de las GnRHa y en especial de la LHRHa han aumentado debido a sus ventajas en comparación con otros métodos de inducción. Los reportes de inducción con la LHRHa son numerosos, desde el primer trabajo en carpas y salmones (Donaldson y Hunter, 1983) hasta los trabajos realizados con especies de importancia en la acuicultura como el sabalote (*Chanos chanos*) (Marte *et al.*, 1987) o la lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Alvariño *et al.*, 1992).

Respecto a lutjánidos existen varios reportes de inducción hormonal; Arnold *et al.* (1978) y Minton *et al.* (1983) reportan trabajos con *L. campechanus* utilizando manipulación foto-térmica y tratamientos hormonales con gonadotropina humana (HCG) para la maduración final de los oocitos y el desove. Estos trabajos representan los reportes pioneros con los lutjánidos en el mundo. Más adelante, Soletchnik *et al.* (1989) reporta inducción al desove en otro lutjánido, la rubia (*Ocyurus chrysurus*) utilizando HCG. En el pargo de mangle (*Lutjanus argentimaculatus*) también existen reportes de inducción al desove con HCG y LHRHa (Emata, 2003). Watanabe *et al.* (1998) al trabajar con pargo criollo (*L. analis*) obtuvo desoves espontáneos tras la aplicación de HCG. Respecto a *Lutjanus peru* también hay reportes de inducción al desove. Por ejemplo, Pintos-Teran *et al.* (2003) utilizan la HCG para lograr el desove en *L. peru* estableciendo el criterio necesario para la inducción hormonal, oocitos mayores a 400 micras. Por su parte, Dumas *et al.* (2004) reportan la manipulación foto-térmica y el uso de HCG para lograr la maduración final y ovulación en organismos mantenidos en cautiverio.

Almacenamiento de semen.

La utilización de semen almacenado como herramienta en la reproducción de especies en cautiverio ha sido muy benéfica, principalmente en especies donde existe una asincronía entre los desoves de machos y hembras. Otras ventajas consisten en el completo aprovechamiento del volumen de semen obtenido haciendo más eficaz su manejo; se pueden mantener bancos de semen de la

mejor calidad; se reduce el manejo de los reproductores, limitando su mantenimiento a las hembras simplemente; se tiene la posibilidad de transportar gametos entre laboratorios, reduciendo la posibilidad de endogamia; y por último, se tiene la capacidad de conservar la variabilidad genética de especies domesticadas (Suquet *et al.*, 2000).

Los métodos usados para el almacenamiento se basan en el tiempo de almacenaje. Periodos cortos (horas a días) al mantener el semen en refrigeración y periodos largos (días-años) al utilizar semen congelado o crioconservado (Chao y Liao, 2001). El principio de conservación se basa en el uso de baja temperatura del medio celular extracelular para disminuir el metabolismo, no consumir energía y poder prolongar el tiempo de vida de la célula espermática.

Refrigeración.

El semen de la mayoría de los peces teleósteos es quiescente en el plasma seminal, por lo tanto su consumo de energía es mínimo. Esto le confiere la capacidad de poder ser almacenado por periodos de tiempo variables desde horas hasta días. Son suficientes temperaturas por arriba del punto de congelación (1 °C a 6 °C) para disminuir el metabolismo y poder prolongar el tiempo de vida del semen de varias especies de peces (Stoss, 1983; Chao y Liao, 2001).

Bajo condiciones de refrigeración es necesario considerar: la temperatura de almacenamiento, para prevenir un choque térmico nocivo para la célula; el intercambio gaseoso, para prevenir que el medio extracelular se torne anóxico; las condiciones de esterilidad, para prevenir la infección del medio con bacterias u hongos; y por último, la posibilidad de dilución del semen en soluciones fisiológicas adecuadas, para permitir prolongar las condiciones fisicoquímicas del medio y aumentar aún más el tiempo de vida celular (Stoss, 1983).

Al utilizar diluyentes se busca mantener al semen en condiciones similares a las del plasma seminal. Por ello, los diluyentes son medios isotónicos, isosmóticos, con capacidad de amortiguar los cambios de pH. Contienen nutrientes, estabilizadores, antioxidantes y, en ocasiones, presentan suplementos

antibacterianos (Stoss, 1983; Rana, 1995a; Suquet *et al.*, 2000). Las principales soluciones utilizadas son: la solución balanceada de Hanks (HBSS), la solución de Ringer para peces, la solución de Stein y Bayrle, el medio Kurokawa y el diluyente Ocean Pout (Medina-Robles *et al.*, 2005). La mejor combinación entre diluyentes y temperatura se debe investigar para cada especie. La medida de respuesta será la calidad del semen al momento de la activación, principalmente la motilidad celular.

Respecto a trabajos referentes a la refrigeración de semen en peces, gran parte de éstos pertenecen a especies de agua dulce, como la trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*), y algunos salmones (*S. salar* y *Oncorhynchus keta*) entre otros (Stoss, 1983). La mayoría hablan de la técnica utilizada, *e.g.* diferentes formas de almacenaje (bolsas de polietileno, tubos Eppendorf), temperaturas de almacenaje (1-10 °C), uso de diluyentes, entre otros. En especies marinas los reportes son pocos, el trabajo de Tiersch *et al.* (2004) con *Centropomus undecimalis* y el de Riley (2002) con *Lutjanus campechanus* son algunos.

Crioconservación.

El principio de crioconservación se basa en que el agua es el elemento más importante para las reacciones celulares; por ello, si el agua presente dentro de la célula se congela, el metabolismo celular cesa y la célula puede ser mantenida en congelación por tiempo indefinido (Rana, 1995a; Medina-Robles *et al.*, 2005). El problema surge al encontrar la velocidad necesaria de congelamiento sin causar daño celular, considerando la cantidad de agua libre presente en la célula y su disponibilidad para cristalizarse durante el congelamiento.

La célula espermática sufre cambios drásticos durante el congelamiento. Primero inicia la formación de hielo en el medio extracelular, resultando en un incremento en la concentración de sales. Esto crea un desequilibrio osmótico en la célula que ocasiona el transporte pasivo de agua hacia el medio extracelular provocando una deshidratación celular. La excesiva deshidratación puede ser nociva al momento de descongelar la célula. Lo anterior puede ser corregido al

controlar velocidad de congelamiento, utilizando agentes crioprotectores, manteniendo la temperatura de congelamiento estable y controlando la velocidad para descongelar la muestra (Medina-Robles *et al.*, 2005).

Aunque la velocidad de congelamiento y descongelamiento son los elementos más importantes para prevenir un daño celular, son los menos estandarizados (Medina-Robles *et al.*, 2005). La variedad de técnicas utilizadas en los peces teleósteos no ha permitido establecer las mejores condiciones de congelamiento. Aún se desconoce el tipo de daño que pueda presentar la célula al ser congelada y descongelada. Las hipótesis más claras hablan de cierto daño en la bícapa lipídica de las membranas celulares. Los fosfolípidos de la membrana, al ser sometidos a estrés térmico se vuelven inestables (gelificación), las proteínas son excluidas de los fosfolípidos y se reagrupan de forma irreversible, provocando que los intercambios célula-medio extracelular se alteren (Labbé y Maisse, 1996). Otra hipótesis se basa en el daño a las mitocondrias. La mitocondria, al ser dañada por el congelamiento, no puede proporcionar la cantidad suficiente de ATP necesario para la motilidad por un tiempo prolongado (Ogier de Baulny *et al.*, 1999). De esta manera, los espermatozoides son incapaces de fusionarse al pronúcleo del oocito por efecto de la baja motilidad celular. La última hipótesis se basa en el daño causado al material genómico. En algunos estudios, la baja tasa de fertilización con semen crioconservado se correlacionó con ADN alterado (Labbé y Maisse, 1996).

Como se mencionó, la utilización de agentes crioprotectores también puede disminuir el daño celular. La función de los crioprotectores es disminuir el efecto de la alta concentración de sales, disminuir el efecto por deshidratación (encogimiento celular) y la de minimizar la formación de cristales de hielo intracelulares. Existen dos tipos de crioprotectores: los que actúan a nivel intracelular y los que actúan a nivel extracelular. Los intracelulares son de bajo peso molecular y son permeables en la membrana celular. Estos agentes entran en contacto con las moléculas del citoplasma estabilizando el medio y los componentes citoplasmáticos. El dimetil-sulfóxido (DMSO) y el glicerol son

ejemplos de este tipo. Los extracelulares son de alto peso molecular y no son permeables. Estos agentes se mezclan con el medio y debido a su alto peso molecular modifican sus características. También entran en contacto con las membranas celulares. Ejemplos de estos son la sacarosa y otros azúcares y soluciones a base de leche en polvo. El DMSO es el crioprotector más utilizado en peces teleósteos, seguido del glicerol y el metanol (Rana, 1995a; Suquet *et al.*, 2000). En menor grado de uso se encuentran soluciones a base de leche en polvo, yema de huevo, azúcares y algunas soluciones de proteínas (Rana, 1995a; Medina-Robles *et al.*, 2005) La combinación de los crioprotectores celulares y de diluyentes de semen utilizados en refrigeración puede ayudar a mejorar la sobrevivencia celular disminuyendo el daño.

En la crioconservación existe gran variedad de técnicas de congelamiento. Desde congelamiento sobre hielo seco, congelamiento en vapores de nitrógeno líquido por diferentes tiempos de exposición, inmersión en nitrógeno líquido, hasta la utilización de máquinas de crioconservación para semen de ganado (Rana, 1995b; Chao y Liao, 2001). Los recipientes de crioconservación más utilizados son crioviales y pajillas francesas de diferente volumen (Medina-Robles *et al.*, 2005). La gran variedad de materiales y de técnicas utilizadas no permite una estandarización de los métodos de crioconservación de semen.

Al igual que en la refrigeración, la mayoría de los reportes de crioconservación hacen referencia a especies dulceacuícolas principalmente ciprínidos y salmónidos. En especies marinas, los trabajos se han intensificado en los últimos años. Alrededor de 30 especies son las que se reportan con trabajos referentes a crioconservación (Suquet *et al.*, 2000). Desde el primer trabajo realizado por Blaxter en la década de los cincuenta con el arenque (*Clupea harengus*), hasta los trabajos realizados con especies de importancia en la acuicultura como la dorada (*Sparus aurata*) (Chambeyron y Zohar, 1990), la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) (Fauvel *et al.*, 1998), el eglefino (*Melanogrammus aeglefinus*) (Rideout *et al.*, 2003) y el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Chereguini *et al.*, 2003). El único trabajo encontrado en Lutjánidos o especies afines es el realizado en el

huachinango del golfo (*Lutjanus campechanus*), al desarrollar una técnica de crioconservación de semen (Riley *et al.*, 2004).

Los múltiples trabajos en diversas especies responden a la necesidad de establecer las técnicas óptimas de almacenaje con diferentes soluciones diluyentes, crioprotectoras y de acuerdo al método de almacenaje (Suquet *et al.*, 2000; Chao y Liao, 2001). Esto se debe a que el semen de cada especie responde de manera diferente al congelamiento. Al igual que en la refrigeración, la más adecuada medida de respuesta al congelamiento será la motilidad celular.

II.4. Descripción de la especie.

Lutjanus peru es conocido como huachinango o huachinango del Pacífico (Figura 4). Pertenece al orden perciformes, y dentro de éste a la familia Lutjanidae (Tabla 1) que está compuesta por 17 géneros y 103 especies siendo el genero *Lutjanus* el más abundante en especies.



Figura 4. Huachinango del Pacífico *Lutjanus peru* (Nichols y Murphy, 1922).

Tabla 1. Clasificación taxonómica del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru*.

Clase:	Osteichthyes
Subclase:	Actinopterygii
Orden:	Perciformes
Familia:	Lutjanidae
Género	<i>Lutjanus</i>
Especie:	<i>peru</i>

Son organismos de cuerpo alargado y comprimido, su hocico es puntiagudo, con boca alargada y grande en posición horizontal con mandíbula inferior ligeramente proyectada hacia delante (Figura 4). Su hocico es fuerte y resistente, en su mandíbula superior posee una línea interior con dientes de tipo canino y cuatro dientes de mayor tamaño sobresalen de la mandíbula superior (Thomson *et al.*, 2000). La aleta dorsal presenta 10 espinas con 12 radios; la aleta anal tres espinas, 8 radios y entre 47 y 52 escamas en serie horizontal bajo la línea lateral.

La especie se distribuye desde la costa sur de la península de Baja California, México, hasta las costas del Perú. Es una especie conocida como continental asociada a fondos rocosos de 120 a 150 metros de profundidad aproximadamente (Thomson *et al.*, 2000). Sus hábitos alimenticios indican que son organismos carnívoros que ingieren peces e invertebrados (Santamaría-Miranda *et al.*, 2003b). Las tallas máximas son de hasta 1000 mm de longitud total (Rocha-Olivares, 1991) mientras que las tallas de primera madurez sexual van desde los 222 mm hasta los 300 mm de longitud total (Rocha-Olivares, 1991; Espino-Barr *et al.*, 1998; Santamaría-Miranda *et al.*, 2003a). Para zonas cercanas a la Bahía de La Paz se reportan tallas de entre 300 mm de longitud total en organismos de primera madurez sexual con 2-3 años de edad aproximadamente (Reyna-Trujillo, 1993).

Las características reproductivas de *L. peru* reportadas hasta el momento indican que es un organismo que presenta una sola época de desove al año y un

desarrollo de tipo asincrónico de los oocitos con desoves parciales (Santamaría-Miranda *et al.*, 2003b; Lucano-Ramírez *et al.*, 2001). Su época de desove está correlacionada con los meses de mayor temperatura del agua y lluvias más constantes, en específico para el estado de Guerrero (Santamaría-Miranda *et al.*, 2003b). Para zonas cercanas a la Bahía de La Paz, los periodos de reproducción se han relacionado también con los meses de mayor temperatura del agua (Reyna-Trujillo, 1993). Se ha descrito el desarrollo de los oocitos durante su ciclo de maduración gonádica mediante técnicas histológicas encontrando siete fases: 1) oocito con cromatina condensada, 2) oocito perinucleolar, 3) oocito con vesículas vitelinas, 4) oocito en previtelogénesis, 5) oocito en vitelogénesis, 6) oocito en vitelogénesis avanzada y 7) oocito maduro (Lucano-Ramírez *et al.*, 2001). Respecto a los machos, el trabajo de Pintos *et al.*, (2004) habla sobre los estadios de desarrollo de los testículos de *L. peru* después de un análisis histológico y bioquímico. Él identificó cuatro estadios de desarrollo durante la época reproductiva del huachinango en localidades cercanas a bahía de La Paz; testículo en madurez temprana, madurez intermedia, madurez avanzada y regresión.

III. JUSTIFICACIÓN.

Históricamente la familia Lutjanidae ha sido considerada como elemento importante de soporte de varias pesquerías en mares tropicales y subtropicales del mundo (Bennerot *et al.*, 1987). Sólo en México, el huachinango *Lutjanus peru* soporta una importante pesquería considerada como una de las más representativas por su alto valor comercial (Anonimo, 2002). Sin embargo, la pesca de organismos por debajo de la talla de primera madurez sexual ha provocado la sobreexplotación del recurso en varias regiones del Pacífico mexicano (Rocha-Olivares, 1991; Reyna-Trujillo, 1993; Díaz-Uribe *et al.*, 2004). Estos últimos autores mencionan que la ausencia de medidas regulatorias podría provocar el colapso de la pesquería en próximos años, por lo menos, en la región del Golfo de California.

Ante este panorama, el interés de cultivo de esta especie se ha incrementado en los últimos años. La necesidad del desarrollo de una tecnología de cultivo es cada vez más fuerte. Actualmente, las únicas actividades acuícolas referentes a esta especie se limitan a la engorda de juveniles silvestres en jaulas flotantes. La ausencia de una tecnología integral de cultivo, ha ocasionado una dependencia total del medio silvestre para proveer juveniles para engorda.

En el CICIMAR-IPN, desde hace varios años se trabaja sobre el desarrollo de una tecnología de cultivo del huachinango. Los resultados obtenidos hasta el momento han permitido dirigir el esfuerzo de investigación hacia la generación de protocolos de reproducción y crianza larvaria en cautiverio. Tener el control sobre el proceso reproductivo en cautiverio permitiría asegurar la producción de juveniles, considerando que el desarrollo de protocolos de cultivo larvario también estén disponibles.

El presente trabajo pretende, establecer un protocolo de maduración final y espermiogénesis con el uso de la LHRHa, proceso que hasta el momento no se ha reportado para esta especie. También, pretende establecer técnicas de

almacenamiento de semen como medio para facilitar la reproducción en cautiverio de esta especie.

IV. OBJETIVOS.

General.

► Resolver problemas de disfunción reproductiva en el huachinango del Pacífico *Lutjanus peru* mediante el desarrollo de técnicas de inducción a la maduración gamética con el factor de liberación de la hormona luteinizante y de almacenamiento de semen.

Particulares.

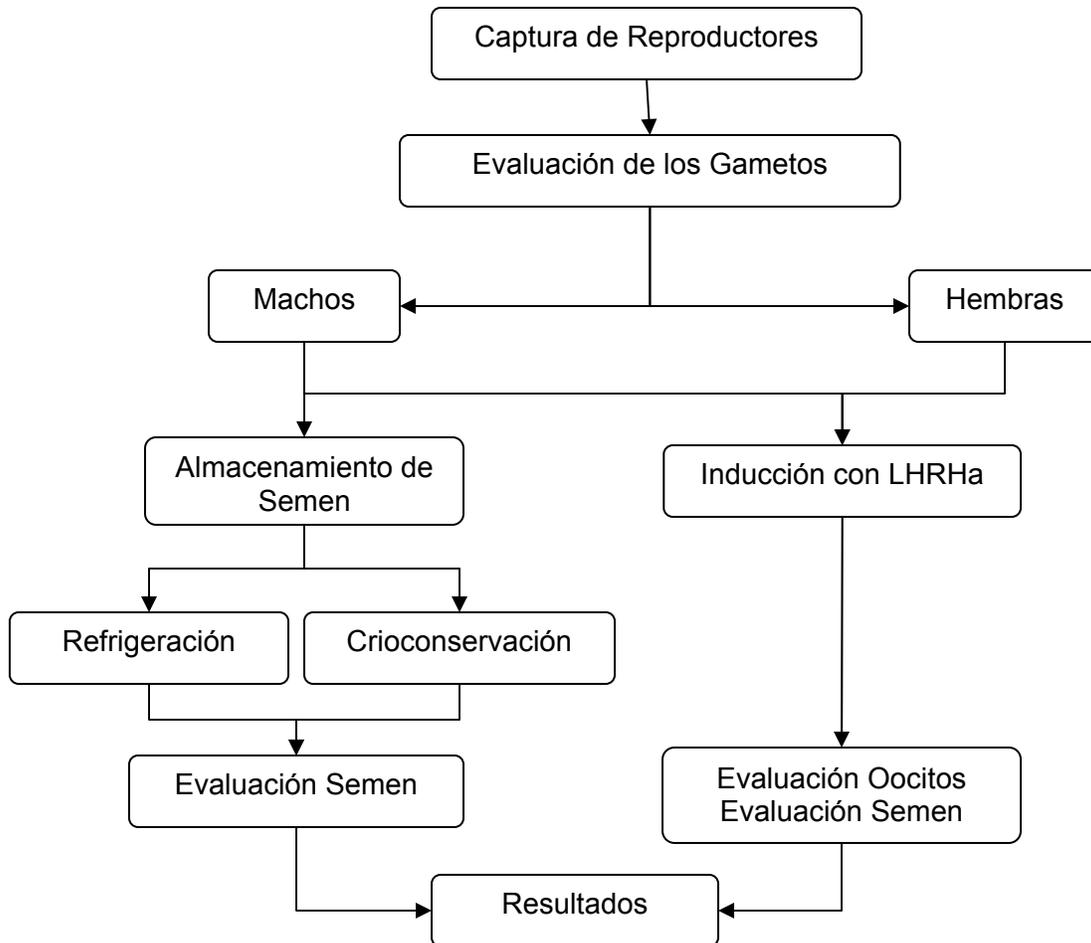
- ◆ Evaluar el efecto de la concentración del factor LHRHa en la maduración final y la ovulación de los oocitos de *L. peru*.
- ◆ Evaluar el efecto de la concentración del factor LHRHa sobre la calidad espermática de machos de *L. peru*.
- ◆ Evaluar la calidad de las células espermáticas de *L. peru* al ser almacenadas en refrigeración a 4 °C por diferentes periodos de tiempo.
- ◆ Evaluar la calidad de las células espermáticas de *L. peru* al ser almacenadas en nitrógeno líquido a -196 °C.

V. HIPÓTESIS.

- ◆ El factor de liberación de la hormona luteinizante LHRHa promueve la maduración final y ovulación de oocitos en hembras maduras recién capturadas del medio silvestre, así como también promueve la espermiogénesis en machos recién capturados del medio silvestre.
- ◆ El semen almacenado en refrigeración a 4° C puede mantener su calidad (motilidad y consistencia) por varios días bajo condiciones adecuadas de mantenimiento, mientras que almacenado en nitrógeno líquido a -196 °C puede mantener motilidad al ser mantenido en soluciones diluyentes y crioprotectoras celulares adecuadas.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS.

Para cumplir con los objetivos propuestos, se planteó el siguiente esquema de trabajo. El diagrama de flujo representa de manera general las fases que integraron el trabajo experimental.



VI.1. Captura de reproductores.

Se capturaron ejemplares adultos de huachinango *Lutjanus peru* en la localidad de La Ribera, municipio de Los Cabos, Baja California Sur, México. La captura se efectuó durante el periodo del 15 de agosto al 30 de septiembre de 2005. La

época de captura concuerda con los meses de actividad reproductiva para esta especie en la Bahía de La Paz y zonas aledañas (Reyna-Trujillo, 1993).

La captura se realizó empleando línea (hilo nylon) y anzuelo. Cuando el pez era asegurado con el anzuelo se subía lentamente hacia la embarcación (más o menos 40 m) y se colocaba en viveros que se sumergían 20 metros. En ocasiones se utilizaron tubos de PVC (70 cm longitud y 25 cm diámetro) como viveros. Estos viveros se sumergían a más profundidad, además de que se evitaba subir cada vivero cuando se colocaba un nuevo tubo con un pez. Esta maniobra también permitía revertir el efecto de la descompresión en los peces.

Para el transporte a la playa, los peces eran sacados del agua y colocados en un tanque de 600 litros de capacidad situado sobre la embarcación. Este tanque contaba con una bomba sumergible de 1100 GPM (Roller R.) que permitía el movimiento del agua y su oxigenación durante el traslado a la playa (más o menos 15 minutos). Para el traslado a la Unidad Piloto de Maricultivo (UPIMA) del CICIMAR-IPN se utilizó un contenedor con capacidad de 1.5 m³. Se suministró oxígeno puro durante el trayecto de aproximadamente dos horas. El agua se enfrió 4 °C aproximadamente debajo de la temperatura ambiente para tratar de reducir el estrés en los peces. El número de organismos por viaje fue de mínimo dos y máximo seis.

Al llegar a la UPIMA, los peces se colocaron en tanques de 600 litros (un organismo por tanque) a temperatura de 25 °C. Se cuidó de no tener más de un grado de diferencia entre la temperatura de transporte y la de los tanques. Cuando un pez presentaba síntomas de descompresión (abdomen abultado y nado en posición invertida) era colocado en tanques de 24 m³ de capacidad. Los tanques eran parte de un sistema cerrado de circulación de agua el cual contaba con filtros mecánicos, biológicos y de luz U.V. así como aireación constante.

VI.2. Evaluación de los gametos.

Al día siguiente de su llegada al laboratorio, los animales se anestesiaron en agua de mar con 400 ppm de 2-fenoxietanol (Sigma Chemicals) hasta su

adormecimiento (pérdida del equilibrio, sin respuesta al manipularlo). Se determinó el peso de cada animal (Tor-Rey Clase III, \pm 10 gramos), se colocó una marca digital (BioMark) y se verificó el sexo ejerciendo ligera presión abdominal. Si salía semen se procedía a su recolección y evaluación. Si no salía semen se procedía a una biopsia ovárica con una cánula de plástico de 2 mm de diámetro exterior y 1 mm de diámetro interior. Se tomó una muestra de oocitos y se realizó la evaluación del estadio de madurez. La evaluación se realizó tal como se describe en la siguiente sección.

Machos.

Después de limpiar el poro genital con agua destilada y secarlo, se colectó el semen con jeringas de plástico estériles (3-5 mL), tomando la muestra directamente del poro genital. La muestra se fraccionó en tubos Eppendorf de un mililitro los cuales se almacenaron en refrigeración a 4 °C. Se realizó el análisis cualitativo y cuantitativo.

Análisis cualitativo: se determinó la fluidez del semen al momento de la recolección. Para ello se generó la siguiente escala.

Tipo I. Nada fluido.

Tipo II. Poco fluido.

Tipo III. Fluido

Análisis cuantitativo: el volumen, la motilidad celular, la viabilidad celular, la concentración celular y el espermatozoido.

El volumen se registró al momento de extraer el semen y fraccionarlo. Se cuidó de no contaminar las muestras con orina. Cuando ocurrió, se utilizó una nueva jeringa para continuar con la recolección. Se registró el volumen obtenido sin considerar la orina. Las muestras contaminadas no se utilizaron en los demás análisis. La motilidad celular (ver anexo uno) se registró inmediatamente después de la activación con agua de mar estimando el porcentaje de células con

movimiento hacia delante solamente en el campo visual observado. La viabilidad celular (ver anexo dos) se registró tomando el tiempo (segundos) cuando el porcentaje de 90, 50, 10 y 0 de las células espermáticas tenían movimiento hacia adelante. La concentración celular se estimó contando en un hemocitómetro (0.02 mm de profundidad, Corning Inc.) (ver anexo tres). El espermatozoide se determinó (ver anexo cuatro) obteniendo la fracción de líquido seminal respecto al volumen total de semen.

Después de extraer la muestra de semen, el pez era mantenido en tanques de concreto de 24 m³ de capacidad hasta que se lograba obtener un lote suficientemente grande para conformar los grupos experimentales, lo que nunca pasó de cinco días.

Hembras.

Se observó el estadio de madurez de los oocitos con una lupa estereoscópica. Se determinó el diámetro de los oocitos con un sistema de análisis digital de imágenes (Image Pro Plus) y se comparó de acuerdo a la clasificación de Lucano-Ramírez (2001) basada en el diámetro de los oocitos. Sólo cuando los oocitos presentaban un diámetro promedio mayor o igual a 400 micras se procedía a realizar la inducción hormonal (Pintos-Terán *et al.*, 2003).

VI.3. Inducción hormonal.

Para la inducción hormonal se utilizó el factor liberador de la hormona luteinizante LHRHa (Des-Gly10, [D-Ala6]-LHRHa SIGMA-USA). El factor fue diluido en solución salina al 0.7% (ver anexo 5). Se utilizaron las concentraciones de 25 µg/kg, 50 µg/kg y 100 µg/kg de peso del pez para las hembras y 25 µg/kg, 50 µg/kg para los machos.

Machos.

Se conformaron dos grupos experimentales que recibieron dosis de 50 µg/kg y 25 µg/kg de LHRHa. La inducción se realizó aplicando una sola inyección

intramuscular justo debajo de la aleta dorsal. 30 horas y 56 horas después de la inducción se procedió a la recolección de semen. Se registraron las características cualitativas y cuantitativas de cada muestra de semen como ya se describió anteriormente.

Hembras.

Se formaron tres grupos experimentales (uno para cada dosis). La dosis total se dividió en dos fracciones iguales para su aplicación. 24 horas después de la llegada de los peces al laboratorio, se aplicó una primera inyección intramuscular debajo de la aleta dorsal (cero horas de inducción). La segunda inyección se aplicó 24 horas después de la primera. A las 40 horas aproximadamente se realizó una biopsia ovárica. En una lupa estereoscópica se observaron los cambios en la apariencia del oocito, lo cual nos permitió estimar de manera aproximada el tiempo necesario para la ovulación. Cuando los oocitos estaban hidratados y ovulados se procedía a realizar un desove manual, realizando masaje en la zona abdominal. El desove se recibió en una charola de plástico limpia y seca. Se registró el tiempo transcurrido entre la primera inyección y el desove (TD), el peso total del desove y se estimó el número de huevos obtenidos por desove tomando en cuenta que 1 g de huevos contiene un promedio de 2660 huevos. Se estimó la fecundidad relativa.

$$\text{Fecundidad relativa} = \text{número de huevos} / \text{peso de la hembra}$$

También se realizó un análisis de regresión lineal con los datos de peso y número de huevos obtenidos de cada hembra.

VI.4. Almacenamiento de semen.

Los experimentos de almacenamiento de semen se dividieron en refrigeración a 4 °C y crioconservación en nitrógeno líquido a -196 °C.

Refrigeración.

Se realizaron dos experimentos. En cada uno, las muestras fueron sometidas a pruebas de refrigeración a 4 °C en combinación con diluyentes (HBSS 200 μ Osm y leche al 10%) y antibióticos (penprocilina) (Tabla 2). En el experimento uno se utilizó 5000 U de antibiótico y en el experimento dos se utilizó 200 U de antibiótico. En cada experimento se usó el semen de cinco diferentes machos.

Tabla 2. Mezclas de soluciones diluyentes y antibiótico utilizadas para la refrigeración de semen de *Lutjanus peru* a 4 °C.

Diluyente	Antibiótico	Identificador
HBSS 200 μ Osm	---	HBSS
HBSS 200 μ Osm	Penprocilina 5000 U	HBSS+P ₅₀₀₀
HBSS 200 μ Osm	Penprocilina 200 U	HBSS+P ₂₀₀
Leche 10%	---	Leche
Leche 10%	Penprocilina 5000 U	Leche+P ₅₀₀₀
Leche 10%	Penprocilina 200 U	Leche+P ₂₀₀
Control	---	Control

1) HBSS 200 μ Osm = Solución salina balanceada Hanks libre de calcio 5.26 g/L NaCl, 0.26 g/L KCl, 0.13 g/L MgSO₄ 7H₂O, 0.04 g/L Na₂HPO₄, 0.04 g/L KH₂PO₄, 0.23 g/L NaHCO₃, 0.66 g/L dextrosa.

2) Leche 10%= Leche evaporada en polvo (Nido-Nestlé) diluida en H₂O destilada estéril.

3) Penprocilina = Bencilpenicilina sódica 6000 U+ Bencilpenicilina procaínica 2000 U.

4) Control = no se agrego ningún diluyente ni antibiótico.

Se diluyó el esperma agregando 10 μ L de semen en 100 μ L de diluyentes con o sin antibiótico. Estas mezclas se colocaron en tubos Eppendorf de 1 mL y se mantuvieron en refrigeración. Se evaluó la motilidad a las 0 h, 24 h, 48 h, 72 h y 96 h de almacenamiento. Para realizar la evaluación, las muestras se sacaron del

refrigerador y se mantuvieron todo el tiempo sobre hielo molido. Cada muestra de semen se evaluó por triplicado.

Crioconservación en nitrógeno líquido.

Se realizó una prueba preliminar para evaluar la toxicidad de los diluyentes en conjunto con los crioconservadores al entrar en contacto con la célula espermática. Posteriormente, se realizó una prueba para evaluar el efecto del tiempo de exposición a los vapores de nitrógeno líquido (NL) y posterior inmersión en NL. Finalmente, se realizó una prueba para evaluar el efecto de la residencia en NL de las células espermáticas.

Toxicidad. Esta prueba se realizó preparando en primera instancia las mezclas de diluyentes (50 μ L) y de crioconservador (50 μ L) (V:V) de la tabla 3. La mezcla se mantuvo en refrigeración a 4 °C durante 30 min para equilibrar su temperatura (mezcla exotérmica). Posteriormente, se agregó 10 μ L de semen, se mezcló y se evaluó la motilidad a los 0 min, 20 min, 40 min y 60 min. Se utilizaron muestras de semen de seis diferentes machos. Durante todo el tiempo de experimentación, las muestras permanecieron sobre hielo molido. No hubo réplica por tratamiento.

Tabla 3. Mezclas de diluyentes y crioconservadores celulares utilizados para la prueba de toxicidad en semen de *Lutjanus peru*.

Diluyente	Crioconservador	Concentración (%)		
HBSS 200	DMSO	5	10	15
HBSS 200	Glicerol	5	10	15
Leche 10%	DMSO	5	10	15
Leche 10%	Glicerol	5	10	15

DMSO=Dimetil-sulfóxido

Tiempo de exposición a vapores de NL. Se realizaron las mezclas diluyente, crioconservador y semen tal como se describió en la sección anterior. Se usaron las mezclas que demostraron menos toxicidad en la prueba anterior. Para esta prueba se utilizaron muestras de semen de cuatro diferentes machos. El congelamiento consistió en colocar las diferentes mezclas con el semen en pajillas francesas (IMVE, Francia) de 0.25 mL de capacidad. Las pajillas fueron llenadas manualmente con 0.22 mL de semen. La pajilla cuenta con un extremo sellado con algodón, en tanto que el otro extremo fue taponado con plástico vinílico (Critoseal, Oxford Labware) después de haber sido llenado. Para congelar las pajillas se utilizó una caja de poliestireno de 15 cm x 20 cm x 20 cm en la cual se colocó el NL a determinada altura y unos soportes de plástico que permitían colocar las pajillas a 3 cm sobre la superficie del NL. Se cuidó que el volumen de nitrógeno se mantuviera siempre en el mismo nivel, para que la altura a las que se encontraban las pajillas fuera la misma. Se probaron diferentes tiempos de exposición a los vapores de NL: 5, 10 y 15 minutos. Se llenaron tres pajillas por cada tiempo de exposición. Después del tiempo de congelamiento, las pajillas se sumergieron en NL en un termo criogénico (Taylor-Wharthon 8x). Después de un mes, las pajillas se descongelaron sumergiéndolas en agua dulce a 30 °C durante 10 segundos y se evaluó la motilidad para cada una.

Crioconservación a largo plazo. Este experimento consistió en realizar la congelación de muestras de semen de nueve machos de acuerdo con las mejores combinaciones obtenidas en las anteriores pruebas. De cada muestra de semen se llenaron doce pajillas y fueron almacenadas en inmersión en nitrógeno líquido. Al cabo de diez meses se descongelaron seis pajillas de cada muestra de semen y se evaluó su motilidad utilizando dos temperaturas para descongelar, 25 °C y 30 °C.

Todos los análisis de crioconservación se realizaron con semen de machos silvestres no tratados hormonalmente que nos proporcionaron algunos pescadores ribereños. El pez debía de haber muerto hacia una hora como máximo o estar sumergido en hielo (no más de 3 horas) para obtener una gónada en buenas

condiciones. La gónada obtenida se transportó en hielo hacia la playa o al laboratorio para obtener la muestra de semen (aproximadamente 2 mL por gónada).

VI.5. Análisis histológico.

Durante la recolección de reproductores para la inducción hormonal se realizaron muestreos de gónadas de machos y hembras con el fin de establecer una referencia del estado reproductivo de la población en el medio natural. Las muestras se procesaron con métodos histológicos. Se tomó una muestra de la gónada en la porción media y se fijó en formol al 10% neutralizado con fosfatos. La muestra fijada se deshidrató en baños sucesivos de alcohol (70%-100%) y se incluyó en parafina. Los cortes se realizaron con un micrótomo (4 μm aproximadamente). Para la tinción se utilizó hematoxilina-eosina. Las laminillas obtenidas fueron observadas en un microscopio a un aumento de 200X y 400X.

VI.6. Análisis estadísticos.

Todos los datos obtenidos (peso de las hembras, diámetro de los oocitos, tiempo de desove y fecundidad relativa) se sometieron a prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y homogeneidad de varianzas de Levine. Cuando los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas fueron transformados utilizando logaritmos base 10 para tratar de cumplir con dichos supuestos. Para determinar si existía diferencias significativas entre el peso de las hembras y el diámetro de los oocitos antes de la inducción se utilizó un ANDEVA con significación estadística de $p=0.05$. Para determinar el efecto de las diferentes dosis en hembras se utilizó un análisis de t de student con significación estadística de $p=0.05$.

Para los machos, se utilizó una transformación arco-seno para datos porcentuales (motilidad y el espermatozoides) y una logarítmica para el resto (viabilidad, concentración espermática y volumen). Sin embargo varios de los datos no cumplían con los supuestos de normalidad y homogeneidad de

varianzas. Por lo tanto se utilizaron pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis con significación estadística de $p=0.05$. Para pruebas de comparación múltiple se utilizó la de Dunn con significación estadística $p=0.05$.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa estadístico STATISTICA versión 6 (Stat-Soft Company) y Statgraphics Centurión XV (Stat Point Inc).

VI. RESULTADOS.

VI.1. Inducción hormonal.

Hembras.

Se presentan en la Tabla 4, los resultados obtenidos tras la inducción hormonal a 15 hembras.

Tabla 4. Peso promedio de las hembras, diámetro promedio de los oocitos antes de la inducción (\emptyset), tiempo transcurrido entre la primera inyección y el desove (T) y fecundidad relativa promedio (FR) en hembras de *Lutjanus peru* tratadas con LHRHa en dosis de 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Dosis LHRHa ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	25	50	100	Promedio	Estadísticos
n	6	7	2		
Peso (kg)	2.8 \pm 0.1 ^a	3.1 \pm 0.4 ^a	2.6 \pm 0.1 ^a	2.9 \pm 0.3	F=0.02 p=0.17
\emptyset (μm)	0.41 \pm 0.0 ^a	0.40 \pm 0.0 ^a	0.41 \pm 0.0 ^a	0.41 \pm 0.0	F=0.12 p=0.86
T (horas)	47.3 \pm 2.4 ^a	47.5 \pm 6.0 ^a	----	47.4 \pm 4.5	T=0.04 p=0.94
FR (huevos/kg)	3.97 x 10 ⁴ \pm 3.99 x 10 ⁴ ^a	4.68 x 10 ⁴ \pm 4.96 x 10 ⁴ ^a	----	4.34 x 10 ⁴ \pm 4.37 x 10 ⁴	T=0.28 p=0.78

En cada renglón las letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

Los valores son promedios más o menos desviación estándar

No hay diferencia significativa en el peso ni en el diámetro de los oocitos de los distintos tratamientos. Las hembras tratadas con dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ no presentaron desoves ya que murieron horas después de la primera inyección (~12-17 h). En las hembras tratadas con dosis de 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ se obtuvieron

desoves en 83% y 86% de las hembras, respectivamente. En las hembras que no consiguieron desovar, se identificó que una no logró completar la ovulación a pesar de tener oocitos hidratados (25 µg/kg) después de 44 horas, y en el otro caso, los oocitos no mostraron con el tiempo de cambio alguno (50 µg/kg) después de 47 horas.

No se encontraron diferencias significativas en el tiempo de desove 47.3 ± 2.2 horas promedio entre ambas dosis. Tampoco se encontraron diferencias significativas en los valores de fecundidad relativa, obteniendo un promedio total de 4.34×10^4 huevos/kg aproximadamente. Sin embargo, se observó una gran variabilidad en el número de huevos obtenidos por desove con ambas dosis. El valor más bajo fue de 21.3×10^4 huevos (50 µg/kg) y el más alto de 3.6×10^5 huevos (50 µg/kg). El análisis de regresión lineal realizado entre el peso de las hembras y el número de huevos por desove mostró un valor de $r=0.16$. No ocurrieron muertes de hembras antes o después del desove, excepto en dos casos (50 µg/kg y 25 µg/kg) después de 24 horas posteriores al desove.

Machos.

El análisis cualitativo realizado a las muestras de semen, así como el volumen de semen obtenido se resumen en la tabla 5. No se obtuvieron diferencias significativas entre los valores del volumen de semen obtenido por dosis aplicada y por muestreo. La cantidad promedio de semen obtenida fue de 3.13 ± 1.04 mL.

Respecto a la caracterización del semen, la mayoría de las muestras correspondían al tipo de semen fluido. Semen con características de poco o nada fluyente solamente se encontraron en muestras extraídas antes de la inducción hormonal (extracción cero horas).

Referente al análisis cuantitativo del semen, no se encontraron diferencias significativas en la concentración celular (K-W=3.48, $p=0.48$) teniendo como promedio total 4.8×10^9 células/mL (Figura 5). Tampoco se encontraron diferencias significativas en los valores del espermatozoides: 16.8% promedio total

(K-W=2.79, p=0.59) (Figura 6). Sin embargo se aprecia una tendencia que muestra que el grupo control presenta el porcentaje de espermatozoides más bajo y la concentración celular más alta. En contraparte, los grupos con inducción hormonal (50 µg/kg y 25 µg/kg) presentan porcentaje de espermatozoides mayor y concentración celular ligeramente más baja que el grupo control

Tabla 5. Caracterización cualitativa y volumen de semen obtenido a las 30 horas y las 56 horas después de la inducción con dosis de 50 µg/kg y 25 µg/kg de LHRHa en machos de *Lutjanus peru*.

Dosis LHRHa	Macho	Volumen obtenido (mL) / caracterización		
		0 Horas	30 Horas	56 Horas
50 µg/kg	1	-- / II	1.4 / III	1.2 / III
	2	-- / II	4.2 / III	2.2 / III
	3	-- / I	0.2 / III	--
	4	-- / II	2.8 / III	2.7 / III
Promedio volumen			2.1 ± 0.8 ^a	2.0 ± 0.4 ^a
25 µg/kg	5	1 / II	5.6 / III	4.8 / III
	6	-- / I	8 / III	3.8 / III
	7	-- / II	3.6 / III	1.3 / III
	8	--	--	--
	9	-- / II	2.4 / III	muerto *
Promedio volumen			4.8 ± 1.2 ^a	3.3 ± 1.0 ^a

I = Nada fluido.
 II = Poco fluido.
 III = Fluido.
 * muerto a las 30 horas
 Las letras indican que no se encontró diferencia significativa (F=1.78, p=0.21).
 Valores promedio más o menos error estándar.

Se encontraron diferencias significativas entre las diferentes combinaciones de dosis y tiempo respecto a la motilidad (K-W=11.02, p=0.026). La dosis de 25 µg/kg a las 56 horas mostró una motilidad significativamente más baja que las demás combinaciones que mostraron una motilidad superior al 95% (Figura 7).

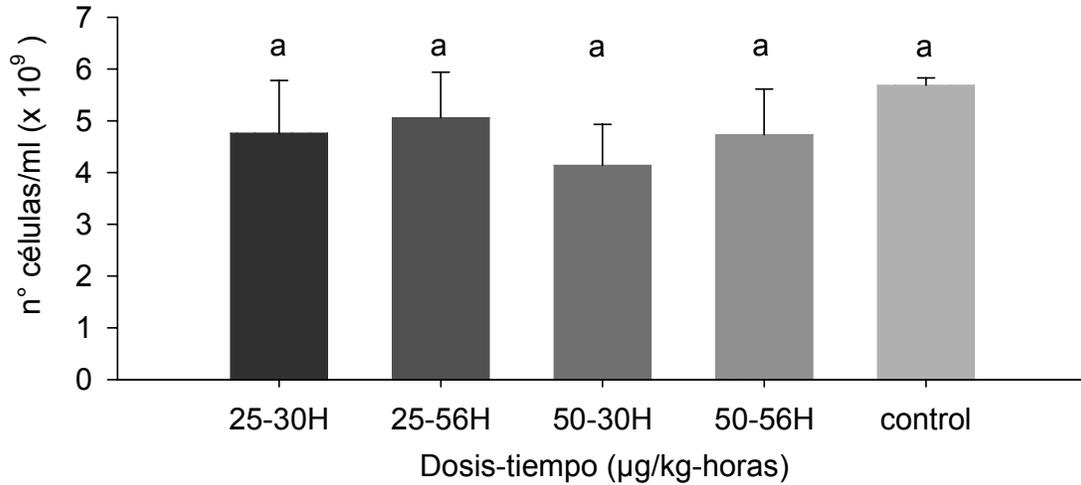


Figura 5. Número de células espermáticas por mililitro obtenidas en semen de *Lutjanus peru*. Las muestras se obtuvieron a las 30 horas y las 56 horas después de la inducción (DPI) con dosis de 25 µg/kg y 50 µg/kg de LHRHa. Las letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($p>0.05$) entre el número de células/mL de cada tratamiento. Barras formadas con valores promedio más o menos error estándar.

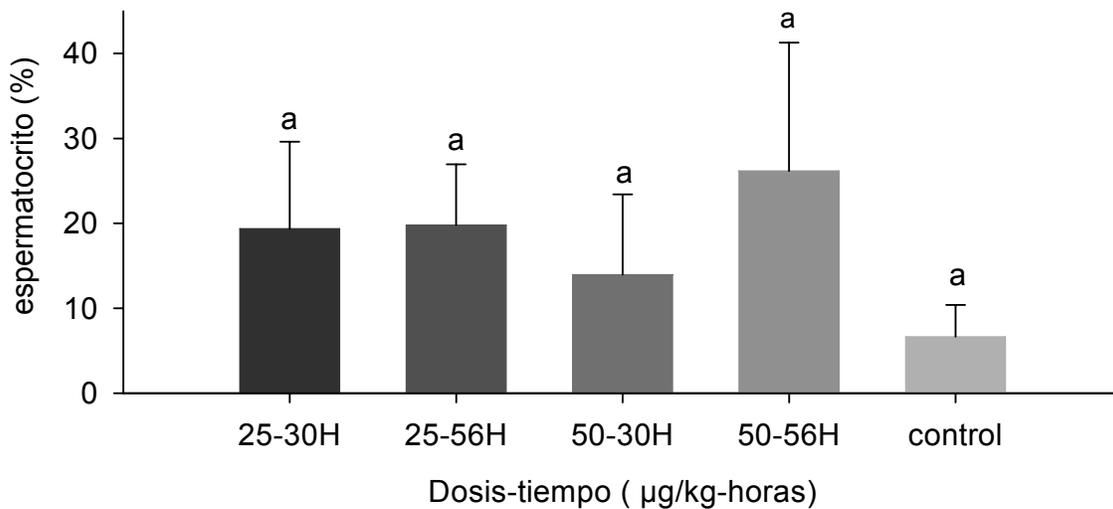


Figura 6. Valores de espermatocrito (%) obtenidos en semen de *Lutjanus peru*. Las muestras se obtuvieron a las 30 horas y las 56 horas después de la inducción (DPI) con 25 µg/kg o 50 µg/kg de LHRHa. Las letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($p>0.05$) entre el espermatocrito de cada tratamiento. Barras formadas con valores promedio más o menos error estándar.

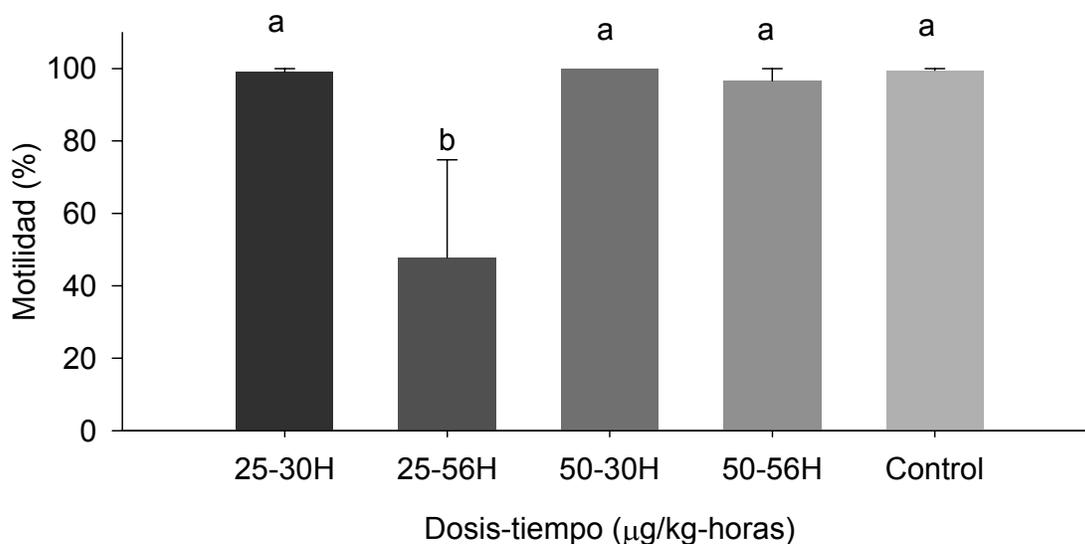


Figura 7. Motilidad de las células espermáticas de *Lutjanus peru*. Las muestras se obtuvieron a las 30 horas y las 56 horas después de la inducción (DPI) con 25 µg/kg o 50 µg/kg de LHRHa. Las letras diferentes indican que hay diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos. Barras formadas con valores promedio más o menos error estándar.

En este caso se sospecha de la probable contaminación con orina al momento de la recolección, que no se pudo detectar, provocando que los registros de motilidad disminuyeran.

La figura 8 muestra las curvas de viabilidad celular. No se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los tratamientos y el grupo control en cada uno de los tiempos registrados (100, 90, 50, 10 y 0% de células activas).

VI.2. Almacenamiento de Semen.

Refrigeración.

En los experimentos de refrigeración (Figura 9) se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la motilidad de los diferentes grupos. En el experimento uno (Figura 9-A), la mezcla con HBSS siempre mantuvo valores de motilidad

significativamente mayores que las otras mezclas (superior al 90%), a excepción del registro a las 48 horas. El grupo control mostró valores altos hasta las 48 horas. Después su motilidad fue significativamente inferior a la encontrada con HBSS pero no significativamente diferente de lo encontrado con las mezclas HBSS+P5000 y leche. La mezcla de leche+P5000 presentó los valores más bajos de motilidad, quedando con inactividad celular después de 48 horas.

En el experimento 2 (Figura 9-B), la mezcla con HBSS también presentó los mejores registros de motilidad (superior a 90%) siendo significativamente superior ($p < 0.05$) al control después de 48 horas. Después de 96 horas su motilidad disminuyó hasta 50%, aunque fue significativamente superior a las otras mezclas y al control. Las mezclas con leche, HBSS+P200 y leche+P200 registraron motilidad significativamente inferior al control y a la mezcla con HBSS a partir de las 24 horas. La mezcla con leche+P200 presentó los más bajos registros de motilidad, con inactividad celular después de 48 horas.

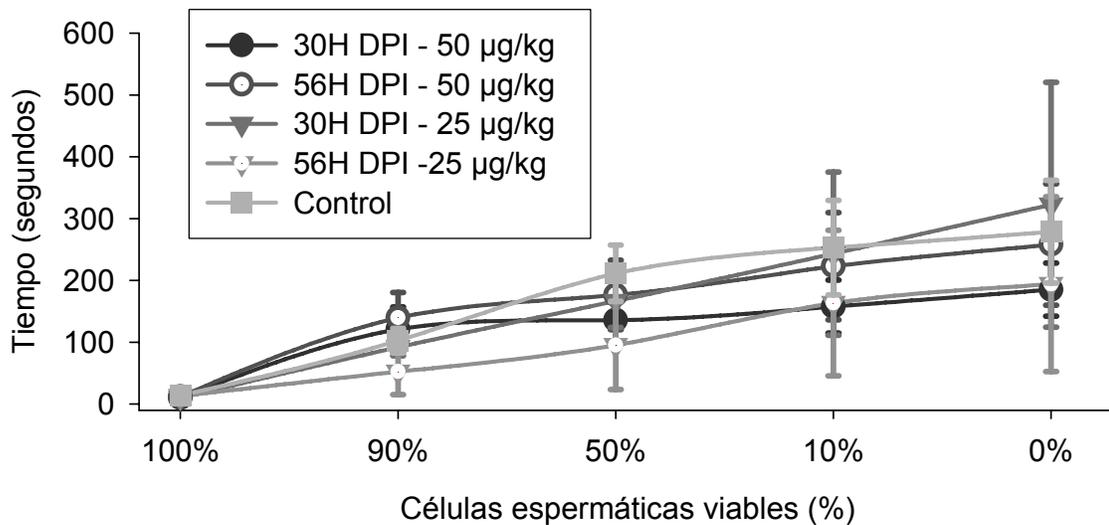


Figura 8. Porcentaje de células espermáticas viables de *Lutjanus peru*. Las muestras se obtuvieron a las 30 horas y las 56 horas después de la inducción (DPI) con 25 µg/kg o 50 µg/kg de LHRHa. Curvas formadas con valores promedio más o menos error estándar.

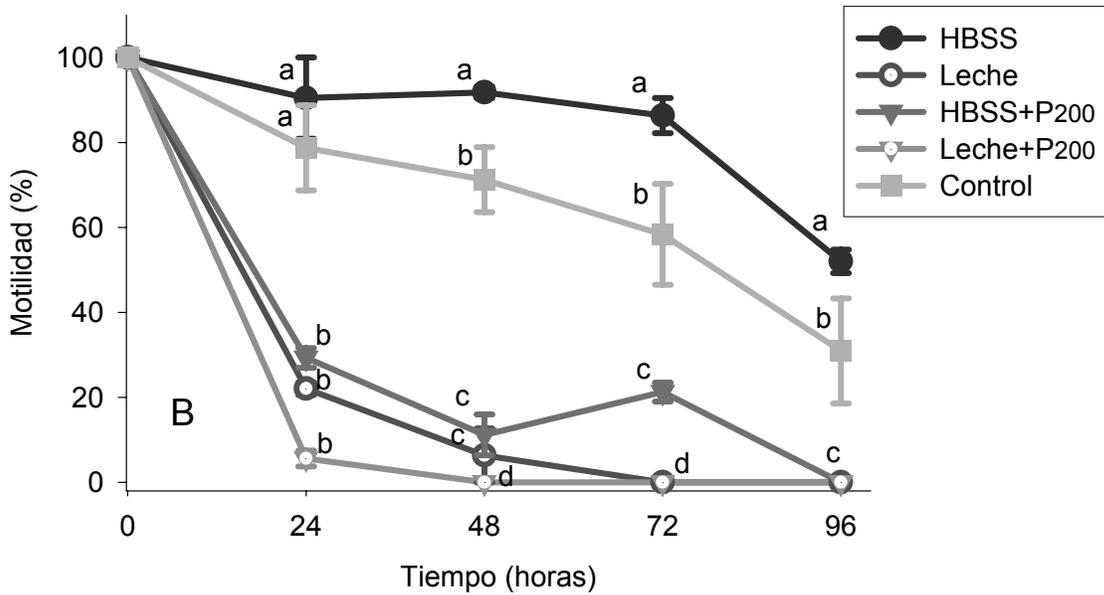
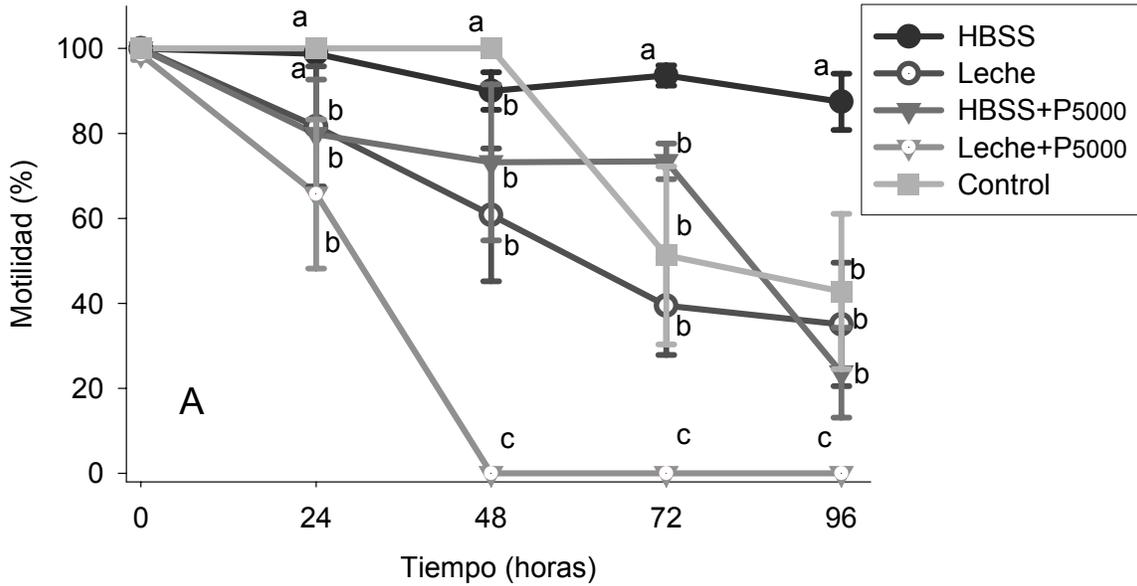


Figura 9 Motilidad (%) de las células espermáticas de *Lutjanus peru*. La activación celular se realizó después de 24, 48, 72 y 96 horas de refrigeración. A) Dosis de penprocilina de 5000 U y B) dosis de penprocilina de 200 U. Las letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos para cada tiempo de registro. Curvas formadas con valores promedio más o menos error estándar.

Crioconservación en nitrógeno líquido.

En las pruebas de toxicidad se observó que el grupo control mantuvo motilidad superior al 90% hasta los 60 minutos en todos los experimentos (Figura 10). Las diferentes mezclas mostraron una disminución en la motilidad después de los 20 minutos de registro. Sólo en algunos casos no fue significativamente diferente del control (HBSS-DMSO 5-10% y leche DMSO 5%, 10% y 15%) (KW=10.4 $p=0.01$; KW=5.17 $p=0.15$). Sin embargo, después de 40 minutos la motilidad de todas las mezclas fue significativamente inferior respecto a la del grupo control.

No se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) entre la motilidad de los diferentes grupos de mezclas a los 20, 40 ó 60 minutos de registro, a excepción de la mezcla HBSS con DMSO 15% a los 20 minutos de medición que mostró motilidad inferior a las demás concentraciones de DMSO 5% y 10%.

Las pruebas de crioconservación mostraron diferencia significativa (KW=96.57, $p<0.05$) entre las combinaciones de diluyentes, crioprotectores y el tiempo de congelamiento después de evaluar la motilidad al descongelar el semen (Figura 11). La mejor mezcla resultó ser HBSS+DMSO 10% en los tres tiempos de congelación, superando el 20% de motilidad. Sin embargo, no fue significativamente diferente de los resultados obtenidos con la mezcla HBSS DMSO 5% a 5 y 10 minutos de congelamiento. La mezcla de HBSS+DMSO 10% utilizada en la última prueba de crioconservación, no mostró diferencia significativa al descongelar las muestras a 25 °C y 30 °C ($F=0.17$, $p=0.68$) obteniendo un promedio de motilidad de 17.05% (Figura 12).

VI.7. Análisis histológico.

De manera general, durante las siete semanas de muestreo, se observó que las hembras presentaron gónadas con oocitos en estado de vitelogénesis avanzada. La figura 13 muestra una micrografía del estado de una gónada obtenida en la cuarta semana de muestreo. Se observan oocitos en varias etapas de desarrollo. Algunos oocitos perinucleolares, caracterizados por

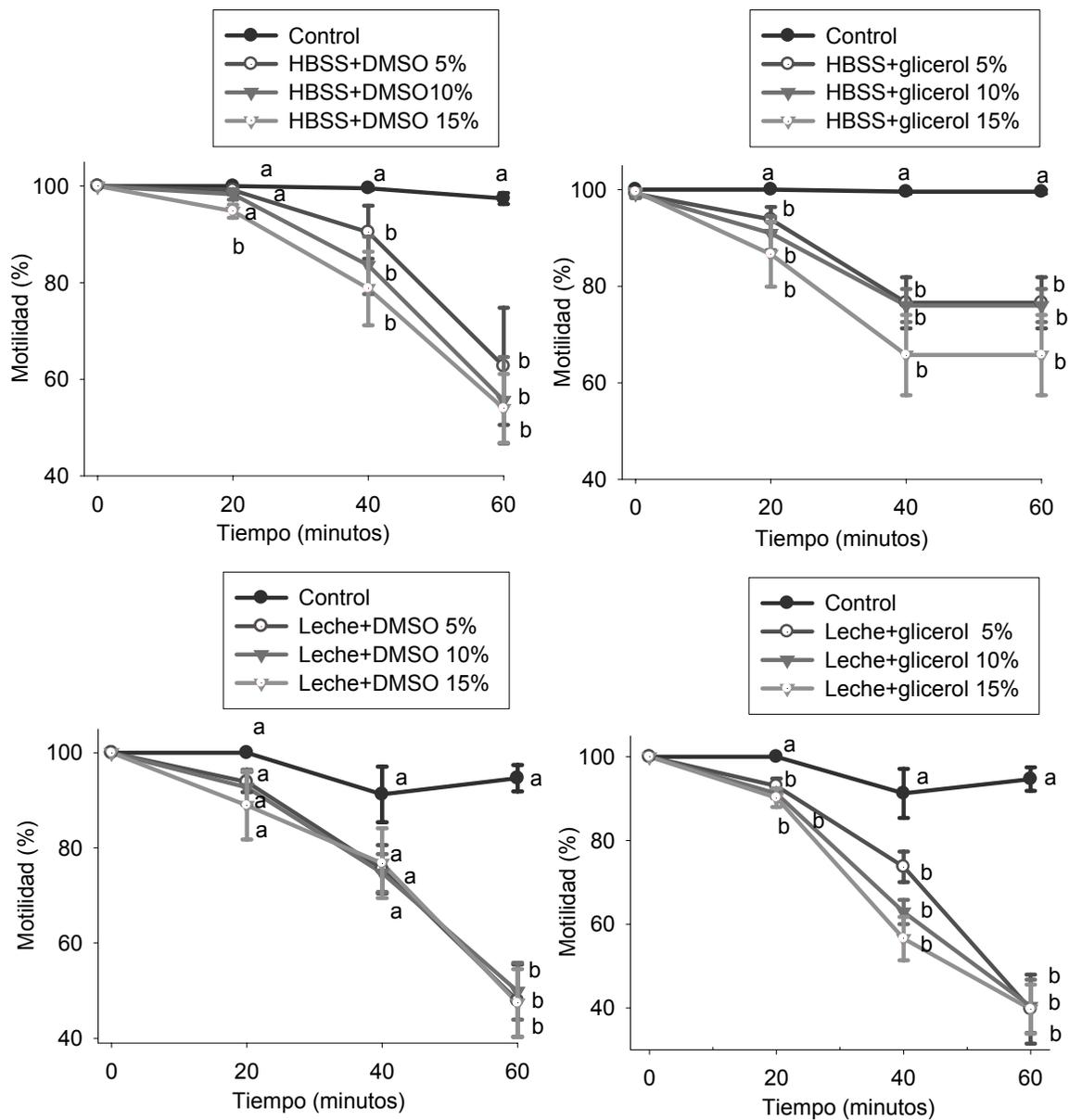


Figura 10. Prueba de toxicidad. Motilidad (%) de las células espermáticas de *Lutjanus peru* después de haber sido diluido con HBSS o leche en combinación con DMSO o glicerol. Las letras en las curvas indican igualdad estadísticamente significativa ($p < 0.05$) para cada tiempo de registro. Curvas formadas con valores promedio más o menos error estándar.

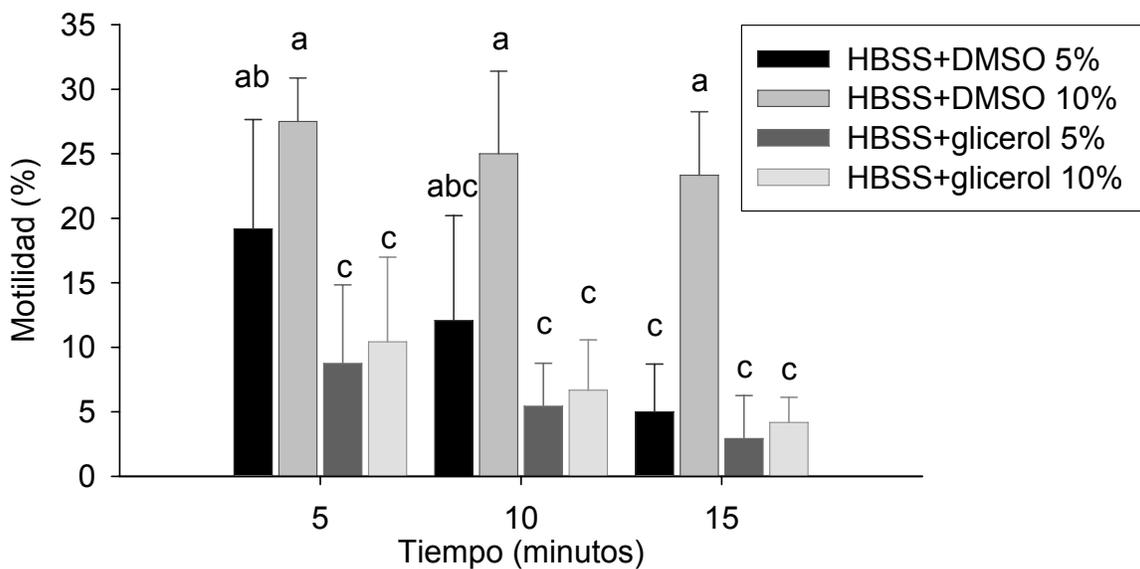


Figura 11. Motilidad de las células espermáticas de *Lutjanus peru* después de haber sido congeladas en nitrógeno líquido con diferentes diluyentes y crioprotectores. El congelamiento se realizó en vapores de nitrógeno líquido con diferentes tiempos de exposición (5, 10 y 15 minutos). Las letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$). Barras formadas con valores promedio más o menos error estándar.

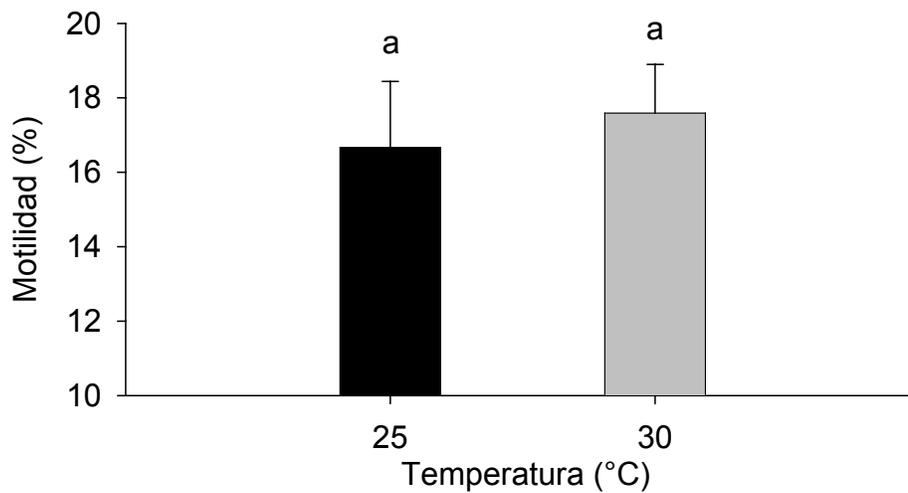


Figura 12. Motilidad de las células espermáticas de *Lutjanus peru* después de haber estar congeladas en nitrógeno líquido con la solución HBSS y DMSO al 10% durante 8 meses. El congelamiento se realizó en vapores de nitrógeno líquido con tiempo de exposición de 10 minutos. Se utilizaron dos temperaturas de descongelamiento 25 °C y 30 °C. Las letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los tratamientos. Barras formadas con valores promedio más o menos error estándar.

presentar el citoplasma teñido homogéneamente, no se observan gránulos de vitelo, el núcleo presenta nucleolos en su periferia. También se observan oocitos en vitelogénesis avanzada caracterizados por ser más grandes, con gran acumulación de gránulos de vitelo en el citoplasma que tienden a ocuparlo en su totalidad. Las células foliculares son evidentes y de mayor tamaño que en los oocitos perinucleolares. Durante todas las semanas de muestreo, sólo una hembra no presentó oocitos vitelogenicos avanzados ya que su gonada estaba compuesta unicamente de oocitos en estado perinucleolar. Una hembra en la cuarta semana presentó oocitos hidratados.

En algunas semanas no se obtuvieron muestras de gónada de machos. Solamente durante la cuarta y sexta semana se obtuvieron muestras. En general, estas muestras presentaron estado de madurez intermedio. La figura 14 muestra una micrografía donde se observa el estado de la gónada. Se observa poco epitelio germinativo (discontinuo), pocas espermatogonias, la mayoría se han transformado en espermatocitos. Se observan los conductos espermáticos con gran cantidad de espermatozoides. Por otra parte, la figura 15 muestra una micrografía de un testículo en estadio de madurez avanzada. De esta gonáda, se obtuvo el semen para los experimentos de crioconservación.

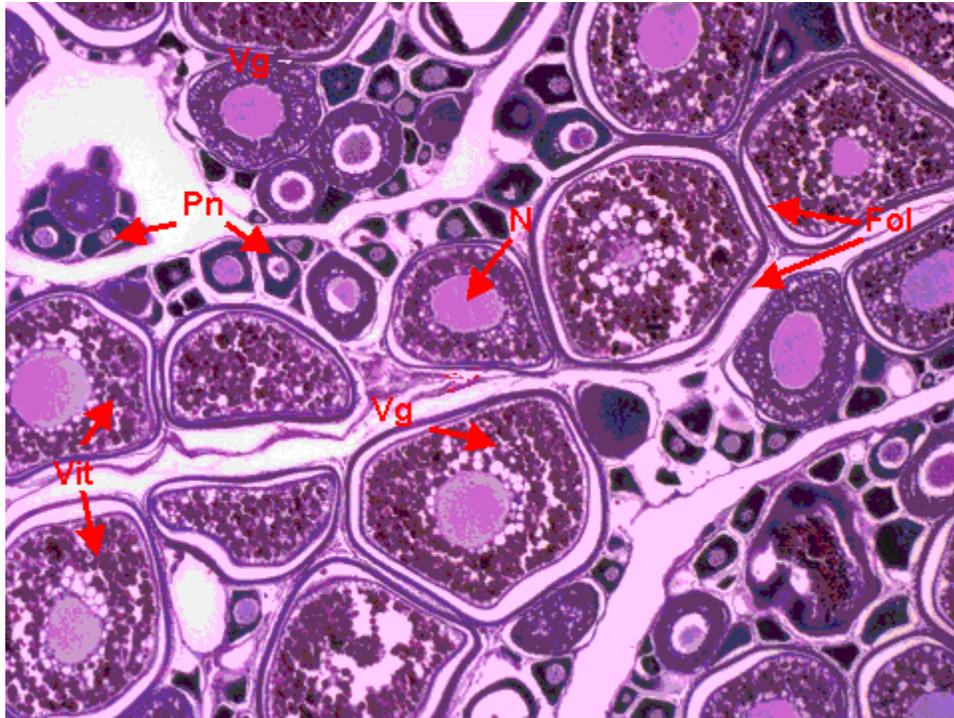


Figura 13. Micrografía de gónada de hembras de *Lutjanus peru* obtenidas en la cuarta semana de muestreo. Se observan varios oocitos en vitelogénesis avanzada (Vg), gránulos de vitelo (Vit) en el citoplasma de los oocitos, capa de células foliculares (Fol). Oocitos perinucleolares (Pn). Vista con aumento de 200X. Técnica de tinción hematoxilina-eosina.

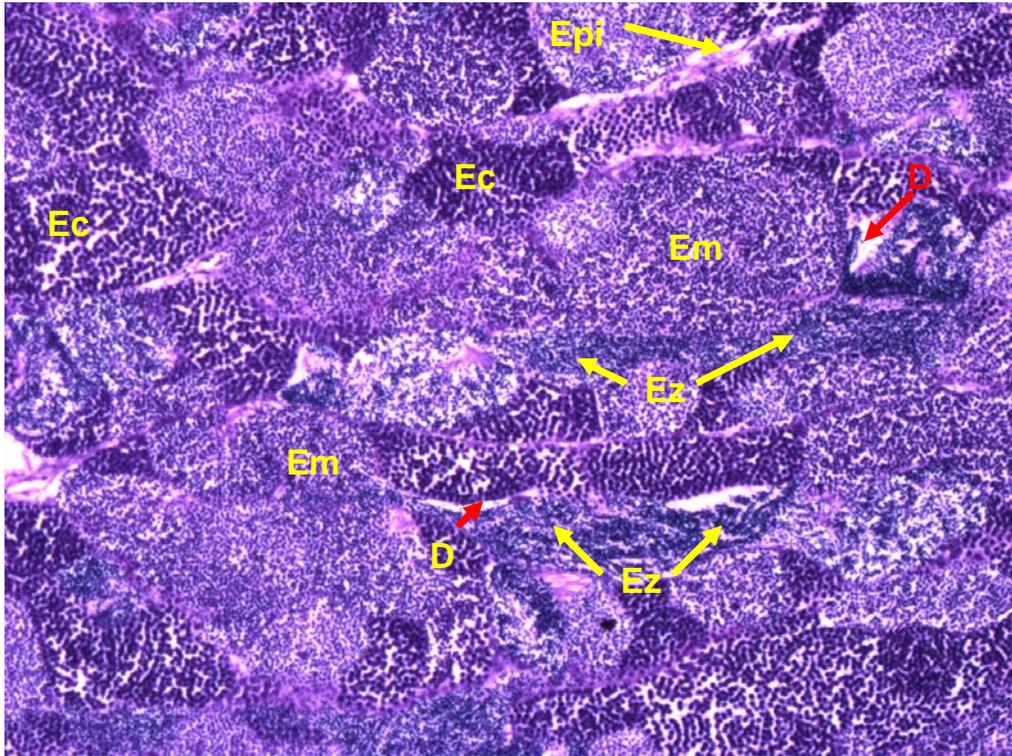


Figura 14. Micrografía de testículo de machos de *Lutjanus peru* obtenido en la sexta semana de muestreo. Se observan algunas zonas con epitelio germinativo (Epi), zonas con espermatocitos (Ec), Espermatidas (Em) y ductos espermáticos (D) con espermatozoides (Ez). Vista con aumento de 400X. Técnica de tinción hematoxilina-eosina.

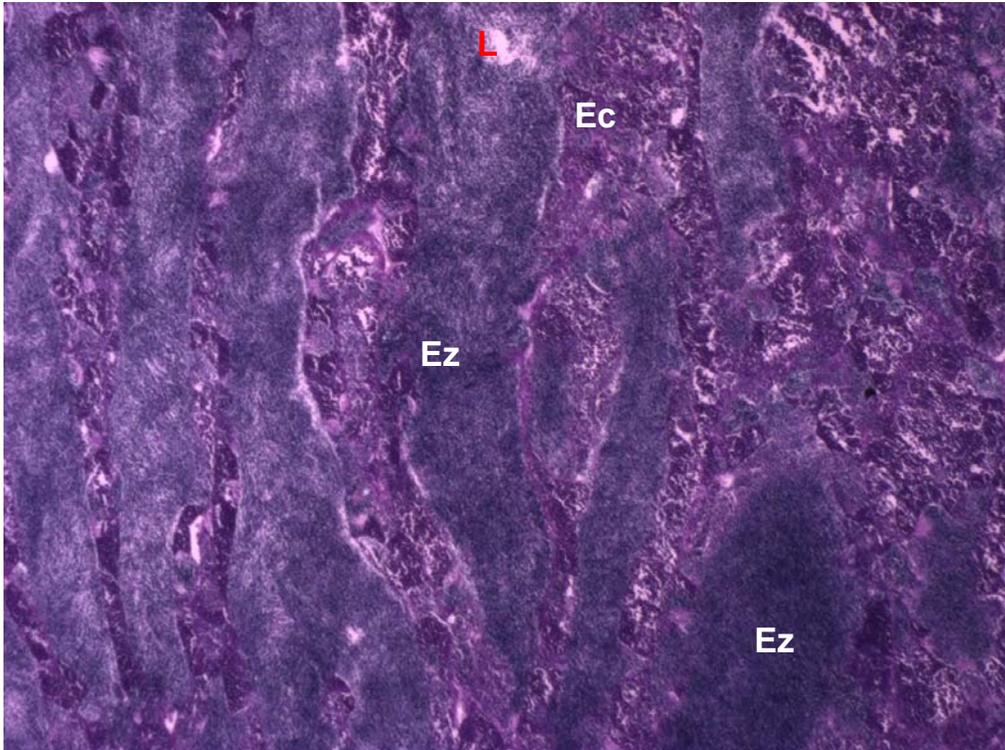


Figura 15. Micrografía de testículo de machos de *Lutjanus peru*. Estas muestras pertenecen a las gónadas utilizadas para la crioconservación. Se observan zonas con espermatocistos (Ec). El lumen de los conductos espermáticos (L) se observa lleno de espermatozoides (Ez). Vista con aumento de 400X. Técnica de tinción hematoxilina-eosina.

VII. DISCUSIÓN.

Durante la última década, se han realizado grandes progresos en cuanto al estudio del comportamiento reproductivo de los peces en cautiverio con fines de cultivo (Zohar y Mylonas, 2001). La inducción hormonal ha sido una herramienta muy importante para desarrollar diferentes estrategias de cultivo. En el huachinango *Lutjanus peru* no ha sido la excepción. En este estudio se reporta por primera vez el uso de una GnRHa (LHRHa) para la inducción al desove de hembras y machos silvestres del huachinango *L. peru*, así como el desarrollo de técnicas de conservación de semen.

VII.1. Inducción a la maduración final y ovulación.

Respecto al estado de madurez de las hembras antes de la inducción se consideró que todas las hembras utilizadas en los experimentos de inducción eran hembras con gónadas maduras y aptas para recibir la inducción con LHRHa. El criterio del diámetro de los oocitos (más de 400 micrómetros) fue suficiente para verificar la madurez de los oocitos considerándolos como oocitos vitelogénicos avanzados (crecimiento secundario) (Lucano-Ramírez *et al.*, 2001). Este mismo criterio también fue utilizado con éxito al inducir hembras de *L. peru* con HCG (Dumas *et al.*, 2004). La utilización de criterios sencillos como este para evaluar la madurez de los organismos también ha sido reportada en otras especies con resultados satisfactorios: *Pagrus major*, *Mugil cephalus* y *Seriola dumerili* (Lee *et al.*, 1988), *L. analis* (Watanabe *et al.*, 1998), *Paralabrax maculatofasciatus* (Pliego-Cortéz y Alcántar-Vázquez, 2002), *L. campechanus* (Riley, 2002) y *L. argentimaculatus* (Emata, 2003) son algunos ejemplos.

Por otro lado, el análisis histológico realizado nos permite mostrar que la mayoría de los organismos muestreados para histología eran animales maduros. En las hembras, sólo una presentó oocitos en estado perinucleolar y eso al principio de la temporada; las demás hembras presentaron oocitos en estado de vitelogénesis avanzada. De acuerdo a la clasificación de Reyna-Trujillo (1993) estas hembras corresponden a etapas maduras. En los machos el número de

muestras para histología fue menor, sin embargo en todos los casos se observan testículos en etapa de madurez intermedia y avanzada de acuerdo a la clasificación de Pintos *et al.* (2004). Estos resultados comprueban que tanto las hembras como los machos utilizado para la inducción hormonal, eran animales maduros y aptos para recibir el tratamiento.

En lo referente a la inducción de hembras con la LHRHa, los resultados obtenidos muestran un efecto positivo de ambas dosis (25 µg/kg y 50 µg/kg) para favorecer el desove. No así en el uso de la dosis de 100 µg/kg. Contrario a nuestros resultados es el reporte de Emata (2003) con *L. argentimaculatus*, este autor reportó el uso de dosis de 50 µg/kg y 100 µg/kg de LHRHa, determinando solo con la dosis de 100 µg/kg, en tanto que en dosis de 50 µg/kg no obtuvo desoves. A diferencia de nuestro trabajo, en este reporte los organismos estaban en jaulas de cultivo con al menos un año de cautiverio. En nuestro caso, la muerte de los organismos con la dosis de 100 µg/kg no la podemos explicar con los elementos que tenemos para evaluar. Además, el bajo número de organismos con esta dosis no permite generalizar que su uso tenga un efecto negativo para inducir desoves en el huachinango.

Por otro lado, el uso de dosis de LHRHa superiores a los 50 µg/kg ha quedado en desuso en los últimos años. En varias especies de peces, se ha reportado un efecto nocivo en los huevos, *e.g.* huevos con bajo porcentaje de fertilización y bajo porcentaje de eclosión. En *Lates calcarifer* (García, 1990) se recomienda el uso de dosis de 38 µg/kg a 75 µg/kg de LHRHa para inducir desoves continuos (dos o más) obteniendo porcentajes de fecundación superiores a los obtenidos con dosis de 150 µg/kg o 300 µg/kg de LHRHa. El mismo efecto se observó en *Epinephelus marginatus* al utilizar dosis de 68 µg/kg donde se reportó menor número de ovulaciones por hembra además de bajo porcentaje de fecundación y eclosión en comparación de la dosis de 30 µg/kg (Marino *et al.*, 2003). Esto ha ocasionado que el uso de LHRHa se prefiera en dosis menores, esto es de 10 µg/kg a 50 µg/kg (Zohar y Mylonas, 2001). Ante este panorama y de acuerdo con lo obtenido en nuestro trabajo, se sugiere que la dosis de 25 µg/kg de LHRHa es la más

recomendable de utilizar, a efecto de realizar pruebas de fecundación y eclosión de huevos no realizadas en este trabajo. También es necesario mencionar que la posibilidad de uso de una dosis aún menor que 25 µg/kg puede resultar también efectivo para inducir desoves en hembras.

En lo que refiere a la fecundidad relativa obtenida en nuestro trabajo, se observa una gran variabilidad. El análisis de regresión realizado entre el peso de la hembra y el número de huevos por hembra, arroja un coeficiente de correlación muy pobre que no permite establecer alguna relación. En general, se reconoce que hembras de mayor tamaño ovularan un mayor número de huevos y que hembras pequeñas contribuirán con menor número de huevos (Munro et al., 1990). En nuestro caso no se aprecia alguna tendencia que pueda comprobar lo anterior, probablemente el bajo número de organismos reportados en nuestro trabajo no permite comprobar lo anterior. En este sentido, el intervalo de huevos obtenido en nuestro trabajo (21,000 - 370,000 huevos) es superior al intervalo reportado por Dumas *et al.* (2004) (5,000 - 35,000 huevos) también en *L. peru*. Sin embargo, estos autores trabajaron con animales madurados en cautiverio e indujeron el desove con HCG. En una especie cercana como *L. argentimaculatus* se reportan valores de uno a dos millones de huevos por desove, aunque estos valores corresponden a la suma acumulada de huevos por hembra y por temporada (Emata, 2003; Ming-Yih *et al.*, 2003). La gran variabilidad de huevos por desove puede explicarse por la estrategia reproductiva que prevalece en esta especie. El huachinango es un desovador asincrónico, por lo que en la gónada coexisten oocitos en diferentes estadios de desarrollo (Lucano-Ramírez *et al.*, 2001). Si la cohorte más avanzada de desarrollo es pequeña, el número de oocitos que responderá a la inducción hormonal también será un número pequeño contribuyendo con un desove pequeño, y viceversa, si la cohorte de oocitos en desarrollo es numerosa el desove podrá ser numeroso. Esto puede representar una ventaja desde el punto de vista de cultivo, ya que con un adecuado protocolo de inducción hormonal, se podrían obtener múltiples desoves durante la época reproductiva.

Otro punto que es necesario aclarar es el método de inducción. En nuestro experimento se decidió realizar la inducción hormonal 24 horas después de la captura del organismo. Este método de inducción ha resultado efectivo en anteriores experiencias realizadas en el CICIMAR (S. Dumas *com. pers.*). Otro método de inducción consiste en aplicar una inyección justo al momento de captura; con este método es posible evitar que ocurra la supresión de las hormonas reproductivas y que los niveles de cortisol se incrementen, ocasionando que el proceso de atresia inicie (Campbell *et al.*, 1992; Clearwater y Pankurst, 1997; Ackerman *et al.*, 2000). Este método ha sido utilizado por Haddy y Pankhurst (2000) al capturar organismos de *Acanthopagrus butcheri* e inducirlos con LHRHa o HCG al momento de captura y 24 horas después. Ellos reportan mayor número de desoves en organismos que fueron inducidos al momento de la captura que aquellos que fueron inyectados 24 horas después. En nuestro experimento, este tipo de inducción también se intentó realizar, sin embargo, considerando las complicaciones en la maniobra de pesca, el manejo del organismo sobre la embarcación y la puesta en viveros de los organismos, se optó por no utilizarla. Sin embargo, de acuerdo a lo obtenido en el porcentaje de desoves se considera que el método de inducción utilizado fue efectivo.

VII.2. Inducción a la espermiogénesis.

En lo referente a la espermiogénesis, nuestros resultados confirman un resultado positivo de inducción con LHRHa. En primera instancia, se reporta que la inducción favorece el incremento en el volumen de semen en machos con poca o nula espermiación antes de la inducción. Este incremento en volumen de semen es un efecto directo de la acción de las GnRH (LHRHa), tal como ha sido reportado para otras especies, como *Salmo salar*, *Lates calcarifer*, *Acanthopagrus schlegeli* y *Pagrus auratus* (Weil y Crim, 1983; García, 1990; Chang *et al.*, 1991; Pankhurst, 1994). De acuerdo con lo expuesto en antecedentes, las GnRH estimulan la síntesis y liberación de las GtH (FSH y LH). Las GtH actúan sobre las células de Sertoli donde estimulan la producción de 17α - 20β -DP (20β -S), el cual es responsable de la espermiación y maduración final de los espermatozoides

(Nagahama, 2000). Ante esto, un incremento de los niveles normales de $20\ \beta\text{-S}$, provoca que la producción de fluido seminal aumente por arriba de lo normal, esto es, la hidratación de los espermatozoides aumenta y por lo tanto el volumen del semen también (Vermeirssen *et al.*, 2000). Este proceso de estimulación y respuesta es bastante rápido, por lo que el efecto se puede observar pocas horas después de la inducción. Por ejemplo, en *Pagrus auratus*, después de cuatro horas de inducción con LHRHa, el volumen de semen aumenta, registrando niveles mayores de GtH en plasma que al momento de la inducción (Pankhurst, 1994).

En nuestro experimento, se observó un incremento en volumen seminal después de 30 horas de la inducción. Este volumen es suficiente para llevar a cabo la fecundación de varios miles de huevos, de acuerdo a experiencias de fecundación realizadas con *L. peru* en el CICIMAR (S. Dumas *com pers*). En la literatura no se reportan valores de volumen de semen para otros lutjánidos; sin embargo, en otras especies, los volúmenes reportados son muy variables y dependen de la especie. *e. g.* en *Siganus guttatus* se reportan volúmenes de 2 mL/kg a 12 mL/kg (García, 1993), en *Limanda ferruginea* de 1 mL/kg a 1.7 mL/kg, en *Scophthalmus maximus* de 0.2 mL a 2 mL por desove (Suquet *et al.*, 1994), en *Melanogrammus aeglefinus* volúmenes de 5 mL a 9 mL por desove (Trippel y Neil, 2003).

En los valores de espermatocrito y en los de concentración celular no se observa un claro efecto del uso de LHRHa. Según Mylonas *et al.* (2003) el uso de las GnRH provoca dos cosas: 1) el aumento en el volumen del fluido seminal (hidratación del semen) mostrado anteriormente; 2) el aumento en la concentración celular. En nuestro trabajo no se observó un incremento significativo en el número de células espermáticas después de la inducción, sin embargo sí observamos una tendencia de incremento en la fluidez del semen (mayor porcentaje de espermatocrito). Este fenómeno es reportado como el primer efecto perceptible después de la aplicación de LHRHa, siendo el segundo efecto

perceptible el incremento en el número células horas después (García, 1990, 1991; Mylonas *et al.*, 1997; Lim *et al.*, 2004).

Desde el punto de vista de cultivo resulta de la mayor importancia mantener machos maduros y con semen fluido durante la mayor parte de la época reproductiva, que organismos maduros y con semen fluido sólo por un par de días. En nuestro experimento no se pretendía evaluar la espermiación a lo largo del tiempo, sin embargo, la posibilidad de realizarlo queda latente considerando que García (1993) reporta machos de *Siganus guttatus* con semen fluido hasta por cinco semanas después de inyecciones semanales de LHRHa; o el reporte de Pérez *et al.* (2000) con *Anguilla anguilla*, en el cual también se mencionan organismos con semen fluido durante diez semanas con inyecciones semanales de HCG. Otro que ha permitido mantener a los organismos maduros por periodos de tiempo prolongados ha sido la utilización de implantes hormonales a base de colesterol. Estos métodos permiten la liberación gradual de la hormona sin necesidad de inyecciones repetidas como en los anteriores ejemplos. En *Hippoglossus hippoglossus* se puede mantener la condición de machos maduros hasta por 40 días con un implante de GnRH (Vermeirssen *et al.*, 2000). Lim *et al.* (2004) por su parte reportan machos de *Rhombosolea tapirina* con semen fluido hasta por tres semanas con un implante de LHRHa. La utilización de inyecciones repetidas o de implantes hormonales podría ser una opción para mejorar la espermiación en *L. peru*, siendo más recomendable el uso de implantes hormonales, ya que éstos disminuyen el contacto con los organismos minimizando el estrés.

Otro elemento evaluado en este trabajo fue la motilidad celular. La motilidad de las células espermáticas se ha referido como uno de los elementos mas sencillos y prácticos para evaluar la calidad del semen (Zohar y Mylonas, 2001; Tripel, 2003). La motilidad celular es un parámetro que se ha relacionado con la calidad espermática. Algunos autores refieren algún grado de correlación entre la motilidad de las células espermáticas y la capacidad de fertilización. Por ejemplo Fauvel *et al.* (1999) en su reporte con semen de *Dicentrarchus labrax* observó que

una mayor motilidad se correlaciona en mayor grado con tasas de fertilización elevadas. En nuestro trabajo, se observó que los registros de motilidad se mantuvieron generalmente por arriba del noventa por ciento. Esto nos refiere a que el uso de LHRHa no altera la motilidad de las células espermáticas de *L. peru*, considerándolo como semen de buena calidad.

Otro parámetro que también se ha relacionado con la calidad del semen, es el tiempo de viabilidad celular. Un tiempo de viabilidad celular prolongado, hace referencia a semen con adecuada reserva energética, capaz de mantenerse activo por tiempo prolongado, característica que podría favorecer a la célula en el momento de la fecundación (Fauvel *et al.*, 1999; Trippel, 2003). Los reportes existentes hablan de una gran variación en los tiempos de viabilidad espermática. Por ejemplo, en especies sujetas a cultivo como *Dicentrarchus labrax* y *Sparus auratus*, los periodos con el mayor número de células en movimiento son de uno a dos minutos, respectivamente (Lahnsteiner y Patzner, 1998; Fauvel *et al.*, 1999) o hasta de 20-60 minutos, como en *Scophthalmus maximus* (Suquet *et al.*, 1992; Geffen y Frayer, 1993). En nuestro caso, la viabilidad celular se observó de aproximadamente 300 segundos con un intervalo de máxima actividad celular durante los primeros 100 segundos. De acuerdo con Billard (1995) y Trippel (2003), la gran variación se debe principalmente a las propias características de cada organismo: la variabilidad genética, la reserva energética de cada célula y el estrés provocado por la manipulación del organismo. Aunque por otro lado, también se considera consideran que el factor más determinante en la variación de los resultados se debe al efecto de la mezcla del semen justo al momento de activarlo con agua de mar; es decir una mezcla incorrecta provocaría que las células se activaran de forma asincrónica, en tanto que una mezcla correcta permitiría que las células se activen homogéneamente, obteniendo tiempos de viabilidad celular similares (Rana, 1995b).

Existen otros factores no considerados en este estudio que también son utilizados como parámetros para evaluar calidad, *e.g.* la velocidad de nado de la célula, la frecuencia de movimiento del flagelo, el patrón de movimiento y la

activación celular (Cosson *et al.*, 1985; Rurangwa *et al.*, 2004). Sin embargo, el parámetro más contundente para verificar la calidad del semen es la fertilización (Rurangwa *et al.*, 2004). Desafortunadamente por problemas de asincronía con los desoves de las hembras no fue posible llevar a cabo pruebas de este tipo con el semen que se obtuvo.

VII.3. Almacenamiento de semen.

Refrigeración.

Como se menciona anteriormente, el semen es inmóvil en el plasma seminal y bajo esta característica es que el semen puede tener la capacidad de almacenamiento temporal (Stoss, 1983). La inmovilidad de las células espermáticas depende de las características del medio donde las células estén suspendidas. Bajo esta supuesto es que en varias especies de peces se haga referencia a la concentración de iones (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) la presión osmótica, pH, temperatura y grado de dilución como los factores implicados en la inmovilidad de las células espermáticas en el plasma seminal (Hadi-Alavi y Cosson, 2005; 2006).

El conocimiento sobre las características químicas del plasma seminal ha permitido el desarrollo de soluciones diluyentes con características muy similares a las del plasma, esto con el propósito de optimizar el proceso de almacenamiento de semen. Varios son los diluyentes que han sido desarrollados con variable éxito en su uso. En nuestros experimentos, se obtuvo que la solución de HBSS 200 μ Osm sin calcio resultó ser el mejor diluyente para conservar semen de *L. peru*. Se observó que el semen diluido con HBSS mantenía motilidad aceptable (superior al 80%) por lo menos tres días después de refrigeración. Esta misma solución también ha sido utilizada como diluyente de semen de otra especie. Por ejemplo, Riley (2002) al realizar experimentos de refrigeración en semen de *L. campechanus* reporta motilidad hasta por nueve días a 4 °C, aunque la motilidad después de 24 horas es menor que el 80%. Tiersch *et al.* (2004) por su parte, al refrigerar semen de *Centropomus undecimalis* reporta motilidad hasta por 22 días

a 1 °C, aunque también observó bajo porcentaje de motilidad, menor a 80% después de tres días de almacenamiento.

Las características químicas de la solución HBSS responden a las exigencias típicas de un diluyente para peces marinos: mantiene inactivo al semen a través de un entorno extracelular químicamente estable, generalmente iso-osmótico a la célula. Por ejemplo, en la concentración utilizada de 200 μOsm , se considera como una solución hipo-osmótica en comparación con el agua de mar de 800-1000 μOsm y a la del plasma seminal en peces marinos 240-400 μOsm . Además la ausencia de iones Ca^{2+} en su composición química, son los principales elementos que le confieren la capacidad de mantener inactivo al semen (Billard, 1995). Esto está en relación con el proceso de activación de la motilidad celular. En peces marinos se ha propuesto que la activación celular ocurre cuando dos factores se mezclan: uno la concentración excepcional de iones Ca^{2+} de origen extracelular combinado con un medio de suspensión hiper-osmótico a la célula (Hadi-Alavi y Cosson, 2006). De acuerdo a Cosson (2004), el proceso de activación inicia con la suspensión de la célula en un medio hiper-osmótico al plasma seminal, seguido de un proceso de osmoregulación celular del espermatozoide debido al cambio de medio. Como efecto del cambio tan drástico en la osmolaridad celular, la membrana celular se modifica provocando que algunos canales de transporte se activen, principalmente aquellos relacionados con el transporte de iones Ca^{2+} y K^+ . El rápido incremento en la composición de iones dentro de la célula provoca que el motor celular se incremente (aumento en los niveles de ATPasas) ocasionando la motilidad del flagelo inicie. Conforme las reservas de ATP disminuyen el movimiento del flagelo también decrece.

Por otra parte, el uso del otro diluyente utilizado, a base de leche evaporada en polvo, no mostró ventajas e incluso se obtuvo menor motilidad que en el grupo control. Se considero el uso de este diluyente por su disponibilidad, facilidad de preparación y precio accesible, en comparación con la solución HBSS. Los diluyentes a base de leche son comúnmente utilizados para refrigerar semen de bovinos y ofrecen buenos resultados (Curry, 2000), y también son utilizados como

diluyentes en peces de agua dulce (Rana, 1995; Medina-Robles *et al.*, 2005). Otra ventaja de los diluyentes que es importante señalar, es que las muestras de semen diluido siempre permanecieron con la condición acuosa (fluido), mientras que las muestras sin diluir sufrieron desecación y la condición de semen fluido se perdió conforme pasaban los días.

Tanto en nuestros experimentos como en los ejemplos expuestos, no se reporta el uso de O₂, CO₂ u otro tipo de gas para evaluar el efecto en la motilidad espermática. De acuerdo con algunos autores, la necesidad de oxígeno en el medio extracelular se relaciona con el almacenamiento de ATP, ya que bajo condiciones de anoxia disminuye sus niveles normales resultando en la pérdida de motilidad (Billard *et al.*, 2004). Por ejemplo, en experimentos realizados con semen de trucha se reportó que las muestras mantenidas bajo una atmósfera de oxígeno puro pueden mantener una capacidad de fertilización mayor que el semen en aire atmosférico (Billard, 1981), sin embargo no reportan valores de motilidad. En muestras de semen de esturión (*Acispenser baerii*) mantenidas en condiciones de anoxia, se reportó disminución en el contenido de ATP y disminución en la motilidad, después de 24 horas de almacenamiento a 4 °C (Billard *et al.*, 1999). Con lo anterior, se podría hablar de algún efecto nocivo provocado por la falta de una atmósfera pura de oxígeno en las muestras utilizadas en nuestro experimento. Sin embargo al no tener elementos para evaluar lo anterior se descarta esa posibilidad.

La utilización de antibiótico como suplemento para inhibir el crecimiento de bacterias en el medio, tuvo un efecto negativo en la motilidad espermática. A reserva de un estudio de conteo de colonias bacterianas en las muestras almacenadas (no realizado en este trabajo) no se observaron indicios de crecimiento bacteriano. La utilización de antibiótico en concentración de 5000 U mostró mejores registros de motilidad en comparación con la de 200 U; sin embargo, en ambos casos, las células presentaban un tiempo viable muy reducido, menor a 20 segundos, en comparación con las soluciones sin antibiótico que podían mantener su motilidad después de la activación hasta por varios

minutos. En nuestro estudio, no teníamos antecedentes del uso de penprocilina en el almacenamiento de semen, por ello, se decidió utilizar una concentración arbitraria de 5000 y 200 unidades como la utilizada en varias especies de esturiones (Billard *et al.*, 2004). Respecto a esto, un estudio realizado con semen de tilapia (*Oreochromis niloticus*) demostró que la utilización de gentamicina, ampicilina y penicilina (750 mg/L, 750 mg/L y 50 U respectivamente) tenía un efecto negativo en la viabilidad celular afectando las mitocondrias y por lo tanto, la motilidad celular (Segovia *et al.*, 2000). De igual manera, en semen de carpa (*Cyprinus carpio*) se han observado deformidades en la estructura celular, tales como la pérdida de las características estructurales del flagelo, la aparición de formaciones ajenas a la cabeza del espermatozoide y la deformación de la membrana nuclear y celular, al utilizar 50 U de penprocilina después de 6 días de almacenamiento a 4 °C (Saad *et al.*, 1988). Otro elemento que no logramos explicar se refiere a los mejores resultados en el uso de penicilina a 5000 U en comparación con la de 200 U. A pesar de ello, y por lo mostrado al usar ambas dosis, se sugiere que las concentraciones fueron demasiado altas para su utilización en las pruebas de refrigeración.

Crioconservación.

El diseño de una técnica de crioconservación de semen es un proceso bastante complejo y laborioso que comprende varias fases de investigación. Una de las primeras fases corresponde a la elección de los crioprotectores que se utilizarán. El dimetil-sulfoxido (DMSO), el glicerol y el metanol son los crioprotectores que comúnmente se reportan en la literatura referente a la conservación de semen en especies marinas (Rana, 1995). Los tres crioprotectores han mostrado ser efectivo en su utilización, aunque algunos autores reportan al metanol como el crioprotector mas toxico debido a su alta capacidad para diluir materia orgánica (Kwantong y Bart, 2003). Por esta razón, en nuestro estudio se decidió utilizar solo al DMSO y al glicerol como crioprotectores.

Respecto a la concentración utilizada de los crioprotectores, la mayoría de los reportes habla de un intervalo entre 1% al 25 %, tanto para DMSO como para el

glicerol (Rana, 1995b; Lahnsteiner *et al.*, 1996; Urbányi *et al.*, 1999; Horváth y Urbányi, 2000; Kwantong y Bart, 2003; Rideout *et al.*, 2003; Billard *et al.*, 2004; Rideout *et al.*, 2004; Riley *et al.*, 2004; Tiersch *et al.*, 2004), aunque también es necesario mencionar que las concentraciones bajas son preferidas por considerarse menos tóxicas a la célula (Suquet *et al.*, 2000).

La evaluación de la toxicidad de los crioprotectores representa otra fase de investigación que es necesario de analizarse. Anteriormente se había mencionado el efecto benéfico de los crioprotectores celulares al momento de congelar alguna célula, aunque por otro lado también se sabe del efecto dañino de estos sobre la célula (Rana, 1995; Medina-Robles *et al.*, 2005). Este es uno de los parámetros menos estudiado y más variable en las diferentes técnicas de crioconservación reportadas. En nuestro estudio, en todos los casos se observó un efecto tóxico de los crioprotectores utilizados que se reflejaba en la disminución de la motilidad espermática después de agregar los crioprotectores. De acuerdo a lo anterior, se determinó que el intervalo de tiempo utilizado para el equilibrio entre la célula y las mezclas protectoras fuese de 20 minutos. Respecto a este punto, existe una controversia en cuanto al tiempo de equilibrio. Algunos autores mencionan que el espermatozoide al ser una célula pequeña no necesita mucho tiempo para que los crioprotectores penetren (Suquet *et al.*, 2000). En tanto que otros autores mencionan un tiempo de 20 a 30 minutos es necesario para obtener un buen rendimiento de los crioprotectores (Lahnsteiner *et al.*, 1996; Lahnsteiner *et al.*, 2004; Riley *et al.*, 2004; Tiersch *et al.*, 2004). Por otro lado, es necesario conocer las características de los crioprotectores. Tanto el DMSO como el glicerol son crioprotectores considerados como permeables a la célula. El DMSO es una molécula que tiene la capacidad de penetrar más rápidamente a la célula debido a su interacción con los fosfolípidos de la membrana celular (Ogier de Baulny *et al.*, 1999). El glicerol es una molécula de mayor peso que el DMSO, que tarda más tiempo en penetrar la membrana celular (Harvey, 1983). Tomando en cuenta todo lo anterior, se podría hablar acerca de la necesidad de establecer un tiempo de equilibrio entre célula y crioprotector, aunque finalmente, la respuesta celular a

cada crioprotector es especie específica y debe ser evaluada forzosamente (Lahnsteiner *et al.*, 1996).

La otra fase de se refiere a la de congelamiento. En nuestro estudio se determinó que el DMSO y el glicerol al 5% y 10% junto con la solución HBSS serían las mezclas a utilizar en las pruebas de conservación en nitrógeno líquido. La solución a base de leche se descartó para su uso como diluyente debido a las características de bajo rendimiento mostradas en las pruebas de refrigeración. Al final se observó una tendencia que muestra que el DMSO al 10% resultó ser el mejor crioprotector utilizado a los tres tiempos de congelamiento. Sin embargo, nuestros resultados de motilidad son aun muy bajos en comparación con los reportes de otras especies como *Lutjanus campechanus* (motilidad de 80%) (Riley *et al.*, 2004) o *Centropomus undecimalis* (motilidad de 35%) (Tiersch *et al.*, 2004) los cuales utilizan la misma mezcla, de HBSS junto con DMSO. Solo en *Acipenser brevirostrum*, la motilidad fue mas baja (10%) que nuestros resultados, utilizando la misma mezcla de crioprotector y diluyente (Horvath *et al.*, 2005). Cabe mencionar, que los estudios mencionados anteriormente se desarrollaron utilizando maquinas para congelar semen de ganado, por lo cual la velocidad de cambio en la temperatura de congelamiento es totalmente controlada. En nuestro estudio, esta velocidad se intento controlar variando la distancia entre las pajillas que contienen el semen y el nitrógeno líquido. Sin embargo, debido a lo complicado del diseño experimental, se decidió usar solamente una distancia para congelar. Aun así no se descarta la posibilidad de desarrollar experimentos en un futuro tratando, modificando esta distancia.

El último parámetro evaluado correspondió a la diferente temperatura para descongelar las pajillas con semen. Nuestros resultados no muestran diferencias entre las dos temperaturas utilizadas. El utilizar la temperatura de 25 °C y 30 °C, responde principalmente a la necesidad de realizar ensayos de fecundación en un futuro, considerando con ello que este intervalo de temperatura corresponde al que comúnmente se encuentra en el agua del laboratorio entre marzo y septiembre. Aún bajo esta consideración, la temperatura utilizada en nuestros

experimentos se encuentra dentro del intervalo de temperatura utilizado comúnmente para descongelar semen de peces marinos; desde 1 °C hasta los 50 °C (Suquet *et al.*, 2000). Respecto a esto, la principal recomendación para descongelar semen se refiere a la velocidad para descongelar. Se recomienda que el proceso de transición de estado sólido a líquido se realice abruptamente; de -196 °C a temperatura por arriba del punto de congelación del agua 0 °C; ya que de esta manera se causa el menor daño a la célula (Rana, 1995a). Esto ha sido demostrado en experimentos con semen de *Micropogonias undulatus* y *Macrozoarces americanus* donde al descongelar la muestra a menor temperatura ($\approx 1^\circ\text{C}$) la motilidad fue inferior que con temperatura de 25 °C y 50 °C (Gwo *et al.*, 1991; Yao *et al.*, 1995). Por otro lado, es necesario mencionar que a pesar de los bajos registros de motilidad obtenidos en nuestros resultados, la prueba más contundente del efecto de la crioconservación en la célula espermática es la fecundación. Desafortunadamente, por razones técnicas, no fue posible realizar pruebas de este tipo con el semen almacenado.

VIII. CONCLUSIONES.

El uso de inductores hormonales para favorecer la maduración de peces en cautiverio es una práctica muy socorrida por los acuicultores en los últimos años. En este reporte, se presenta por primera vez el uso de la LHRHa para inducir desoves en *L. peru*. Los resultados obtenidos permiten concluir que la LHRHa en dosis de 25 µg/kg o 50 µg/kg favorece la maduración final y ovulación en hembras de *L. peru*, así como la espermiogénesis en machos con poca o nula espermiación. Sin embargo, de acuerdo a experiencias previas con el uso de la LHRHa en el CICIMAR, se recomienda que el uso de la dosis de 25 µg/kg sea el más adecuado desde el punto de vista económico.

Otro elemento también utilizado por los acuicultores ha sido el uso de semen almacenado en eventos de reproducción en cautiverio. El uso de este tipo de técnicas permite por un lado optimizar el uso del semen, así como facilitar el manejo de reproductores limitando el manejo solo a las hembras. En este trabajo se obtuvo que el semen de *L. peru* puede ser refrigerado a 4° C hasta por 72 horas y mantener motilidad superior a 80%. Los mejores resultados se obtuvieron cuando el semen fue diluido en la solución balanceada de Hank 200 µOsm sin calcio. En nuestro trabajo se obtuvo que la leche evaporada en polvo no sirva como diluyente de semen, por lo menos, para esta especie. Además, que los suplementos de penprocilina tampoco muestran gran ventaja en su uso al refrigerar semen. En la crioconservación de semen, se concluye que el diluyente HBSS 200 µOsm sin calcio y el crioprotector dimetil-sulfóxido (DMSO) al 10% fueron las mejores soluciones para almacenar semen a -196 °C. El mejor registro de motilidad se obtuvo cuando el tiempo de congelamiento de cada muestra fue de 10 minutos y una temperatura de descongelamiento de 25 °C.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, serán de gran utilidad para el desarrollo de una técnica de reproducción del huachinango bajo cautiverio. Sin embargo, los resultados obtenidos aun no son definitivos y pueden ser mejorados con mayor investigación.

IX. RECOMENDACIONES.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permiten hacer las siguientes sugerencias para estudios futuros relacionados con la inducción a la reproducción y almacenamiento de semen del huachinango *L. peru*.

1. Que en estudios futuros de inducción al desove, se realice a través del uso de implantes hormonales de alguna GnRH α . Esto permitirá hacer más eficiente el manejo de los reproductores, se podrá utilizar la condición de desovador asincrónico de hembras *L. peru* en beneficio de múltiples desoves en una época reproductiva y mantener la condición de machos con semen fluido por más tiempo. Además de incrementar la posibilidad de obtener desoves espontáneos en cautiverio.
2. Se sugiere el uso de dosis de LHRH α en concentraciones más bajas a las reportadas en este experimento. Esto permitirá reducir el costo de inducción al utilizar menos hormona.
3. Para estudios futuros de almacenamiento de semen a corto plazo, se sugiere el uso de una mezcla de oxígeno en el contenedor de semen para tratar de prolongar el tiempo de vida de las células espermáticas. Así como un mejor manejo de las muestras de semen que permitan un mejor contacto de las células con el ambiente gaseoso.
4. También se sugiere evaluar el efecto del antibiótico en concentración menor a las utilizadas en este trabajo y realizar cultivos bacterianos con muestras de semen con y sin antibiótico con el fin de evaluar su efecto directamente.
5. En estudios futuros de crioconservación de semen, es necesario evaluar el congelamiento de semen a diferente altura de exposición a vapores de nitrógeno líquido. Probablemente esto permitirá obtener diferentes velocidades de congelamiento en las muestras. También se sugiere incrementar el tiempo de equilibrio entre la célula y los crioprotectores más allá de 20 minutos. Un tiempo prolongado probablemente resultará en una

mayor mortalidad del semen aunque permitiría que el crioprotector penetre más la célula, resultado en una sobrevivencia mayor después de la crioprotención.

6. Finalmente se recomienda realizar estudios de fecundación para evaluar el potencial de fecundación de semen almacenado tanto por refrigeración como por crioprotención.

X. LITERATURA CITADA.

- Ackerman, P., B. Forsyth, C. Mazur & G. Iwama. 2000. Stress hormones and the cellular stress response in salmonids. Fish Physiol. and Biochem., 23: 327-336.
- Alvariño, J., S. Zanuy, F. Prat, M. Carrillo & E. Mañanos. 1992. Stimulation to ovulation and steroid secretion by LHRHa injection in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of time and day. Aquaculture, 102: 177-186.
- Anónimo 2002. Anuario Estadístico de Pesca. SAGARPA, CONAPESCA. Mazatlán, Sinaloa. México. 266 p.
- Anónimo 2003. Advances in fish reproduction and their application to broodstock management. Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos. Zaragoza España.
- Arnold, C., J. Wakeman, T. Williams & G. Treece. 1978. Spawning of red snapper (*Lutjanus campechanus*) in captivity. Aquaculture, 15: 301-302.
- Bennerot, K., W. Fox & S. Powers. 1987. Reproductive strategies and the management of snappers and groupers in the Gulf of Mexico and Caribbean. 561-604. En: Polovina, J. & S. Ralston, (Eds.). Tropical Snapper and Groupers: Biology and Fisheries Management. Westview Press, Colorado, U.S.A. 639 p.
- Billard, R. 1981. Short-term preservation of sperm under oxygen atmosphere in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Aquaculture, 23: 287-293.
- Billard, R. 1995. Sperm physiology and quality. 25-52. En: Bromage, N. & R. Roberts, (Eds.). Broodstock Management and Egg and Larval Quality. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 414 p.
- Billard, R., J. Cosson, F. Fierville, R. Brun, T. Rouault & P. Williot. 1999. Motility analysis and energetics of the Siberian sturgeon *Acipenser baerii* spermatozoa. J. Appl. Icth., 15: 199-203.
- Billard, R., J. Cosson, S. B. Noveiri & M. Pourkazemi. 2004. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. Aquaculture, 236: 1-9.

- Campbell, R., T. Pottinger & J. Sumpter. 1992. Stress reduces the quality of gametes produced by rainbow trout. Biol. Reprod., 47: 1140-1150.
- Chambeyron, F. & Y. Zohar. 1990. A diluent for sperm cryopreservation of gilthead seabream, *Sparus aurata*. Aquaculture, 90: 345-352.
- Chang, C., W. Yueh & M. Lee. 1991. Effects of LHRH-A and hCG on the steroid profiles of bisexual and mature male and female protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. Aquaculture, 92: 83-92.
- Chao, N. & C. Liao. 2001. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. Aquaculture, 197: 161-189.
- Chereguini, O., I. García de la Banda, M. Herrera, C. Martínez & M. De la Hera. 2003. Cryopreservation of turbot *Scophthalmus maximus* (L.) sperm: fertilization and hatching rates. Aquac. Res., 34: 739-747.
- Clearwater, S. & N. Pankurst. 1997. The response to capture and confinement stress of plasma cortisol, plasma sex steroids and vitellogenic oocytes in the marine teleost, red gurnard. J. Fish Biol., 50: 429-441.
- Cosson, J. 2004. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. Aquac. Int., 12: 69-85.
- Cosson, M., R. Billard, J. L. Gatti & R. Christen. 1985. Rapid and quantitative assessment of trout spermatozoa motility using stroboscopy. Aquaculture, 46: 71-75.
- Curry, M. 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. Rev. Reprod., 5: 46-52.
- Díaz-Uribe, J., E. Chávez & J. Elorduy-Garay. 2004. Evaluación de la pesquería del huachinango (*Lutjanus peru*) en el suroeste del Golfo de California. Cienc. Mar., 30(4): 561-574.
- Donaldson, E. & G. Hunter. 1983. Induced final maturation, ovulation, and spermiation in cultured fish. 351-390. En: Hoar, W., D. Randall & E. Donaldson, (Eds.). Fish Physiology. Academic Press, New York. 469 p.
- Dumas, S., O. Rosales-Velásquez, M. Contreras-Olguín, D. Hernández-Ceballos & N. Silverberg. 2004. Gonadal maturation in captivity and hormone-induced

- spawning of the Pacific red snapper *Lutjanus peru*. Aquaculture, 234: 615-623.
- Emata, A. 2003. Reproductive performance in induced and spontaneous spawning of the mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*: a potential candidate species for sustainable aquaculture. Aquac. Res., 34: 849-857.
- Espino-Barr, E., M. Cruz-Romero & A. García. 1998. Edad y crecimiento del huachinango *Lutjanus peru* (Nichols y Murphy, 1922) Pisces:Lutjanidae en las costas del estado de Colima, México. Av. Inv. Agropec., 7(1): 40-51.
- Fauvel, C., M. Suquet, C. Dreanno, V. Zoono & B. Menu. 1998. Cryopreservation of sea bass *Dicentrarchus labrax* spermatozoa in experimental and production simulation conditions. Aquat. Liv. Res., 11(6): 387-394.
- Fauvel, C., O. Savoye, C. Dreanno, J. Cosson & M. Suquet. 1999. Characteristics of sperm of captive seabass in relation with its potential fertilization. J. Fish Biol., 54: 356-369.
- Fostier, A., B. Jalabert, R. Billard, B. Breton & Y. Zohar. 1983. The gonadal steroids. 277–346. En: Randall, D., W. Hoar & E. Donaldson, (Ed.). Fish Physiology. Academic Press, New York. 475 p.
- García, L. 1990. Advancement of sexual maturation and spawning of sea bass *Lates calacarifer* (Bloch) using pelleted luteinizing hormone-releasing hormone analogue and 17 α -methyltestosterone. Aquaculture, 86: 333-345.
- García, L. 1991. Spermiation response of mature rabbitfish, *Siganus guttatus* Bloch, to luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LHRHa) injection. Aquaculture, 97: 291-299.
- García, L. 1993. Sustained production of milt in rabbitfish, *Siganus guttatus* Bloch, by weekly injection of luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LHRHa). Aquaculture, 113: 261-267.
- Geffen, A. & O. Frayer. 1993. Retention of sperm motility on turbot *Scophthalmus maximus* L.: the effects of time from activation, thermal shock and adenosine triphosphate levels. Aquat. Fish. Manage., 24: 203-209.

- Grier, H. & F. Lo Nostro. 2000. The germinal epithelium in fish gonads: The unifying concept. 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Norway. University of Bergen.
- Gwo, R. C., K. Strawn, M. Longnecker & C. Arnold. 1991. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa. Aquaculture, 94: 335-375.
- Haddy, J. & N. Pankhurst. 2000. The efficacy of exogenous hormones in stimulating changes in plasma steroids and ovulation in wild black bream *Acanthopagrus butcheri* is improved by treatment at capture. Aquaculture, 191: 352-366.
- Hadi-Alavi, M. & J. Cosson. 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. Cell. Biol. Int., 30: 1-14.
- Harvey, B. 1983. Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa. Aquaculture, 32: 313-320.
- Horváth, A. & B. Urbányi. 2000. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish (*Clarias gariepinus*) semen. Aquac. Res., 31: 317-324.
- Horváth, A., R. Wayman, B. Urbányi, K. Wared, J. Deane & T. Tiersch. 2005. The relationship of the cryoprotectants methanol and dimethyl sulfoxide and hyperosmotic extenders on sperm cryopreservation of two North-American sturgeon species. Aquaculture, 247: 243– 251.
- Idler, D. & T. Ng. 1983. Yolk formation and differentiation in teleost fishes. 373-397. En: Hoar, W., D. Randall & E. Donaldson, (Eds.). Fish Physiology. Academic Press, New York. 475 p.
- Kwantong, S. & A. Bart. 2003. Effect of cryoprotectants, extenders and freezing rates on the fertilization rate of frozen striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), sperm. Aquac. Res., 34: 887-893.
- Labbé, C. & G. Maise. 1996. Influence of rainbow trout thermal acclimation on sperm cryopreservation: relation to change in the lipid composition of the plasma membrane. Aquaculture, 145: 281-294.

- Lahnsteiner, F. & R. A. Patzner. 1998. Sperm motility of the marine teleosts *Boops boops*, *Diplodus sargus*, *Mullus barbatus* and *Trachurus mediterraneus*. J. Fish Biol., 52: 726-742.
- Lahnsteiner, F., B. Berger, A. Horváth & B. Urbányi. 2004. Studies on the semen biology and sperm cryopreservation in the sterlet, *Acipenser ruthenus* L. Aquac. Res., 35: 519-528.
- Lahnsteiner, F., R. A. Patzner & T. Weismann. 1996. Semen cryopreservation of salmonid fishes: influence of handling parameters of posthaw fertilization rates. Aquac. Res., 27: 659-671.
- Lahnsteiner, F., T. Weismann & R. A. Patzner. 1992. Fine structural changes in spermatozoa of the grayling, *Thymallus thymallus* (Pisces: Teleostei), during routine cryopreservation. Aquaculture, 103: 73-84.
- Lee, C., C. Tamaru & C. Kelly. 1988. The cost effectiveness of CPH, HCG, and LHRHa on the induced spawning of grey mullet, *Mugil cephalus*. Aquaculture, 73: 341-347.
- Liley, N. & L. Stacey. 1983. Hormones, pheromones and reproductive behavior in fish. 1-49. En: Hoar, W., D. Randall & E. Donaldson, (Eds.). Fish Physiology. Academic Press, Nueva York. 469 p.
- Lim, H., N. Pankhurst & Q. Fitzgibbon. 2004. Effects of slow release gonadotropin releasing hormone analog on milt characteristics and plasma levels of gonadal steroids in greenback flounder, *Rhombosolea tapirina*. Aquaculture, 240: 505-516.
- Lucano-Ramírez, G., M. Villagrán-Santa Cruz, S. Ruiz-Ramírez & T. López-Murillo. 2001. Histology of the oocytes of *Lutjanus peru* (Nichols and Murphy, 1922) (Pisces, Lutjanidae). Cienc. Mar., 27(3): 335-349.
- Maisee, G. 1994. Comparison of different carbohydrates for the cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Liv. Res., 7(3): 217-219.
- Marieb, E. 1999. Essentials of human anatomy and physiology. Benjamin Cummings, San Francisco USA. 588 p.
- Marino, G., E. Panini, A. Longobardi, A. Mandich, M. Finioia, Y. Zohar & C. Mylonas. 2003. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper,

- Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), with a sustained-release GnRHa implant. Aquaculture, 219: 841-858.
- Marte, C., N. Sherwood, L. Crim & B. Harvey. 1987. Induced spawning of maturing milkfish (*Chanos chanos*) with gonadotropin-releasing hormone analogues administered in various ways. Aquaculture, 60: 303-310.
- Matty, A. J. 1985. Fish Endocrinology. Croom Helm & Timber Press, London. 230 p.
- Medina-Robles, V. M., Y. Velasco-Santamaría & P. Cruz-Casallas. 2005. Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. Rev. Col. Cienc. Pec., 18(1): 34-48.
- Millar, R., L. Zhi-Liang, J. Pawson, C. Flanagan, K. Morgan & S. Maudsley. 2004. Gonadotropin-releasing hormone receptors. Endocr. Rev., 25(2): 235-275.
- Ming-Yih, L., I. Chen & L. Fang. 2003. Natural spawning and rearing of mangrove red snapper *Lutjanus argentimaculatus*, larvae in captivity. Isr. J. Aquac. Bamidgeh., 55(1): 22-30.
- Minton, R., J. Hawke & W. Tatum. 1983. Hormone induced spawning of red snapper, *Lutjanus campechanus*. Aquaculture, 30: 363-368.
- Miura, T., C. Miura, T. Ohta, M. Nader, T. Todo & K. Yamauchi. 1999. Estradiol-17 beta stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. Biochem. Biophys. Res. Commun., 264(1): 230-234.
- Morisawa, S. & M. Morisawa. 1986. Acquisition of potential for sperm motility in rainbow trout and chum salmon. J. Exp. Mar. Biol., 126: 89-86.
- Moyle, W., R. Campbell, R. Myers, M. Bernard, Y. Han & Y. Wang. 1994. Co-evolution of ligand-receptor pairs. Nature, 368: 251-255.
- Munro, A., A. Scott & T. Lam, Ed. 1990. Reproductive Seasonality in teleost: Environmental Influences. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, 278 p.
- Mylonas, C., A. Gissis, Y. Magnus & Y. Zohar. 1997. Hormonal changes in male white bass (*Morone chrysops*) and evaluation of milt quality after treatment with a sustained-release GnRHa delivery system. Aquaculture, 153: 301-311.

- Mylonas, C., M. Papadaky & P. Divanach. 2003. Seasonal changes in sperm production and quality in the red porgy *Pagrus pagrus* (L.). Aquac. Res., 34: 1161-1170.
- Nagahama, Y. 1983. The functional morphology of teleost gonads. 125-165. En: Hoar, W. S., D. J. Randall & E. M. Donaldson, (Eds.). Fish Physiology. Academic Press, New York. 452 p.
- Nagahama, Y. 2000. Gonadal steroid hormones: major regulators of gonadal sex differentiation and gametogenesis in fish. 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Norway University of Bergen.
- Ogier de Baulny, B., C. Labbe & G. Maisse. 1999. Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. Cryobiology, 34: 141-149.
- Pankhurst, N. 1994. Effects of gonadotropin releasing hormone analogue, human chorionic gonadotropin and gonadal steroids on milt volume in the New Zealand snapper, *Pagrus auratus* Sparidae. Aquaculture, 125: 185–197.
- Patiño, R. & C. Sullivan. 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. Fish Physiol. and Biochem., 26: 57-70.
- Pérez, L., J. Asturiano, A. Tomás, S. Zegrari, R. Barrera, F. Espinos, J. Navarro & M. Jover. 2000. Induction of maturation and spermiation in the male European eel: assessment of sperm quality throughout treatment. J. Fish Biol., 57: 1488-1505.
- Pintos-Terán, P., M. Rosales-Velásquez, S. Dumas, H. Pliego-Cortéz & J. Alcántar-Vázquez. 2003. Características reproductivas del huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*) en cautiverio. Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura: 615-623.
- Pintos-Terán, P., S. Dumas & E. Mañanos. 2004. Espermatogénesis en el huachinango del Pacífico *Lutjanus peru*. IX Congreso Nacional de Ictiología, Sociedad Mexicana de Ictiología. Villahermosa, Tabasco.
- Pliego-Cortéz, H. & J. Alcántar-Vázquez. 2002. Inducción al desove en la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* Steindachner 1868

- (Pisces:Serranidae) mediante el análogo del factor de liberación de la hormona luteinizante LHRHa. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur, México. 70 p.
- Rana, K. 1995a. Cryopreservation of fish spermatozoa. 151-165. En: Gay, J. & M. Mclellan, (Eds.). *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., Totowa, N.J. 243 p.
- Rana, K. 1995b. Preservation of gametes. 53-75. En: Bromage, N. & R. Roberts, (Eds.). *Broodstock Managment and Egg and Larval Quality*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 414 p.
- Reyna-Trujillo, M. 1993. Desarrollo gonádico y época de desove del huachinango (*Lutjanus peru*) Nichols y Murphy, 1922 (Pisces: Lutjanidae) en Bahía de la Paz, Baja California Sur, México. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara, México. 69 p.
- Rideout, R. M., E. A. Trippel & M. K. Litvak. 2004. Relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and spawning date in wild and cultured haddock. *J. Fish Biol.*, 65: 319-332.
- Rideout, R. M., M. K. Litvak & E. A. Trippel. 2003. The development of a sperm cryopreservation protocol for winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum): evaluation of cryoprotectants and diluents. *Aquac. Res.*, 34: 653-659.
- Riley, K. 2002. Refrigerated storage and cryopreservation of sperm for the production of red snapper and snapper hybrids. Tesis de Maestría. University of North Carolina, E. U. 204 p.
- Riley, K., C. Holladay, E. Chesney & T. Tiersch. 2004. Cryopreservation of sperm of red snapper (*Lutjanus campechanus*). *Aquaculture*, 238: 183-194.
- Rocha-Olivares, A. 1991. Edad y crecimiento del huachinango del Pacífico *Lutjanus peru* (Nichols y Murphy, 1922) Pisces:Lutjanidae en la Bahía de la Paz y zonas adyacentes BCS, México. Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur, México. 212 p.

- Rurangwa, E., D. E. Kime, F. Ollevier & J. Nash. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture, 234: 1-28.
- Saad, A., R. Billard, M. Theron & M. Hollebec. 1988. Short-term preservation of carp (*Cyprinus carpio*) semen. Aquaculture, 71: 113-150.
- Santamaría-Miranda, A., Elorduy-Garay, J., Villarejo-Fuerte, M. y Rojas-Herrera, A. 2003a. Desarrollo gonadal y ciclo reproductivo de *Lutjanus peru* (Pisces: Lutjanidae) en Guerrero, México. Rev. Biol. Trop., 51(2):489-502.
- Santamaría-Miranda, A., Elorduy-Garay, J. y Rojas-Herrera, A. 2003b. Hábitos alimentarios de *Lutjanus peru* (Pisces: Lutjanidae) en las costas de Guerrero, México. Rev. Biol. Trop., 51(2):503-517.
- Schulz, R. & T. Miura. 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. Fish Physiol. and Biochem., 26: 43-56.
- Segovia, M., J. Jenkins, C. Paniagua-Chávez & T. Tiersch. 2000. Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. Theriogenology, 53: 1489-1499.
- Soletchnik, P., M. Suquet, E. Thouard & J. Mesdouze. 1989. Spawning of yellowtail snapper (*Ocyurus chrysurus* Bloch 1791) in captivity. Aquaculture, 77: 287-289.
- Stoss, J. 1983. Fish gamete preservation and spermatozoa physiology. 305-350. En: Hoar, W. S., D. J. Randall & E. Donaldson, (Eds.). Fish Physiology. Academic Press, New York. 469 p.
- Suquet, M., C. Dreanno, C. Fauvel & R. Billard. 2000. Cryopreservation of semen in marine fish. Aquac. Res., 31: 231-243.
- Suquet, M., M. Omnes & C. Fauvel. 1992. Rapid assessment of sperm quality in turbot *Scophthalmus maximus*. Aquaculture, 101: 177-185.
- Suquet, M., R. Billard, J. Cosson, G. Dorange, L. Chauvard, C. Mugnier & C. Fauvel. 1994. Sperm features in turbot *Scophthalmus maximus*: a comparison whit other freshwater and marine fish species. Aquat. Liv. Res., 7: 283-294.

- Swanson, P., J. T. Dickey & B. Campbell. 2003. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. Fish Physiol. and Biochem., 28: 53-59.
- Thomson, D., L. Findley & A. Kerstitch. 2000. Reef fishes of the Sea of Cortez: The Rocky-Shore Fishes of the Gulf of California. The University of Arizona Press, Arizona. 302 p.
- Tiersch, T., R. Wayman, D. Skapura, C. Neidig & H. Grier. 2004. Transport and cryopreservation of sperm of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch). Aquac. Res., 35: 278-288.
- Trippel, E. & S. Neil. 2003. Effects of photoperiod and light intensity on growth and activity of juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). Aquaculture, 217: 633-645.
- Trippel, E. 2003. Estimation of male reproductive success of marine fishes. J. Northwest Atl. Fish. Soc., 33: 81-113.
- Tucker, J. 1998. Marine Fish Culture. Academic Press, London. 506 p.
- Tyler, C. & J. Stumpter. 1996. Oocyte growth and development in teleosts. Rev. Fish Biol. Fisher., 6: 287-318.
- Urbányi, B., A. Horváth, Z. Varga, L. Horváth, I. Magyry & F. Radies. 1999. Effect of extenders on sperm cryopreservation of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell). Aquac. Res., 30: 145-151.
- Vermeirssen, E., R. Shields, C. Mazorra de Quero & A. Scott. 2000. Gonadotropin-releasing hormone agonist raises plasma concentrations of progestogens and enhances milt fluidity in male Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Fish Physiol. and Biochem., 22: 77-87.
- Wallace, R. & K. Selman. 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. Amer. Zool., 21:325-343.
- Watanabe, W., E. Ellis, S. Ellis, J. Chavez, C. Manfredi, R. Hagood, M. Sparsis & A. S. 1998. Artificial propagation of mutton snapper *Lutjanus analis*, a new candidate marine fish species for aquaculture. J. W. Aquac. Soc., 29(2): 176-187.
- Webster, D. & M. Webster. 1974. Comparative vertebrate morphology. Academic Press, Londres. 517 p.

- Weil, C. & L. Crim. 1983. Administration of LHRH analogues in various ways: effect on the advancement of spermiation in prespawning landlocked salmon, *Salmo salar*. Aquaculture, 35: 103–115.
- Yao, Z., L. Crim, G. Richardson & C. Emerson. 1995. Cryopreservation, motility ultrastructure of sperm from the ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.), an internally fertilizing marine teleost. V. Int. Symp. on the Reproductive Physiology of Fish. Austin, Texas (USA).
- Yaron, Z. 1995. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. Aquaculture, 129: 49-73.
- Zohar, Y. & C. Mylonas. 2001. Endocrine manipulations of spawning in culture fish: from hormones to genes. Aquaculture, 197: 99-136.
- Zohar, Y., A. Goren, M. Tosky, G. Pagelson, D. Leibovitz & Y. Koch. 1989. The bioactivity of gonadotropin-releasing hormones and its regulation in the gilthead seabream, *Sparus aurata*: in vivo and in vitro studies. Fish Physiol. and Biochem., 7: 59-67.

XI. ANEXO.

1. Motilidad.

1. Se enfocó el microscopio en el objetivo de 40x observando un portaobjetos excavado seco.
2. Se retiró el portaobjetos de la platina y se colocó 10 μ L de esperma sobre la zona excavada.
3. Se realizó la activación del semen con 80 μ L de agua de mar a 35 ‰ (Instant Ocean, Aquarium Systems).
4. Se mezcló el agua de mar con el semen con la ayuda de la punta desechable de la micropipeta.
5. Se colocó un cubreobjetos y se observó inmediatamente al microscopio en el objetivo de 40x.
6. Se estimó el porcentaje de células con movimiento hacia delante solamente en el campo visual enfocado.

2. Viabilidad celular.

1. Se enfocó el microscopio en el objetivo de 40x observando un portaobjetos excavado seco.
2. Se retiró el portaobjetos de la platina y se colocó 10 μ L de esperma sobre la zona excavada.
3. Se realizó la activación del semen con 80 μ L de agua de mar a 35 ‰ (Instant Ocean, Aquarium Systems) y se puso en marcha el cronómetro.
4. Se mezcló el agua de mar con el semen con la ayuda de la punta desechable de la micropipeta.

5. Se colocó un cubreobjetos y se observó inmediatamente al microscopio con en el objetivo de 40x.
6. Se estimó el % de células con movimiento hacia delante solamente en el campo visual y se registró el tiempo en minutos con segundos. .
7. Se continuó con la estimación registrando el tiempo al cual el 90%, 50%, 10% y 0% de las células hayan dejado de moverse hacia delante.

3. Concentración celular.

1. Se diluyó 5 µL de semen con 3.995 mL de solución salina al 0.7%.
2. Se agitó la mezcla con un “vortex” hasta completa homogeneización de la muestra de semen.
3. Se tomó una pequeña alícuota y se colocó sobre una cámara de Neubauer, de 0.02 mm de profundidad.
4. Se observó la cámara con la ayuda de un microscopio a aumento de 40x.
5. Se contabilizó el número de espermatozoides de cinco bloques de la cámara
6. Se estimó el número de células por mililitro con la siguiente formula.

$$\text{Espermatozoides/mL} = \frac{\text{promedio de células x factor de dilución}}{\text{volumen del recuadro}}$$

$$\text{Factor de Dilución} = 200$$

4. Espermatocrito.

1. Se llenaron 2 tubos de hematocrita (Corning Inc.) por cada muestra de semen.

2. Los tubos fueron centrifugados a 5000 rpm durante 45 minutos (Eppendorf Centrifuge 5416).
3. Se midió el área ocupada por las células espermáticas y el área ocupada por el líquido seminal en el tubo de hematocrita.
4. Se estimó el espermatozoides con la siguiente fórmula.

Espermatozoides = longitud ocupada por el líquido seminal / (longitud ocupada por el líquido seminal + longitud ocupada por el semen) x 100

5. Preparación de la hormona.

Dosis de 50 µg/kg.

1. Se pesaron 4 mg de LHRHa (Des-Gly10, [D-Ala6]-LHRHa SIGMA-USA) y se diluyeron en 10 mL de solución salina 0.7%.
2. Se obtuvo una solución de LHRHa a 400 µg/mL
3. Esta solución se fraccionó en tubos Eppendorf y almacenada a -4°C hasta su uso.
4. Antes de realizar la inducción, el tubo Eppendorf con la hormona se descongeló a temperatura ambiente.
5. Para la inyección se utilizaron jeringas de insulina (1 mL) tomando el volumen necesario de acuerdo al peso del animal. El volumen necesario se calculó como sigue:

400 microgramos en 1 mililitro

50 microgramos en X mililitros

Para facilitar el cálculo se generó la siguiente tabla con los pesos y el volumen a utilizar

Solución con 4 mg. en 10 mL sol. Salina 0.7%: son 400 µg/mL			
Peso pez	Cantidad Total	1ra inyección	2da inyección
2	0.25	0.13	0.13
2.1	0.26	0.13	0.13
2.2	0.28	0.14	0.14
2.3	0.29	0.14	0.14
2.4	0.30	0.15	0.15
2.5	0.31	0.16	0.16
2.6	0.33	0.16	0.16
2.7	0.34	0.17	0.17
2.8	0.35	0.18	0.18
2.9	0.36	0.18	0.18
3	0.38	0.19	0.19
3.1	0.39	0.19	0.19
3.2	0.40	0.20	0.20
3.3	0.41	0.21	0.21
3.4	0.43	0.21	0.21
3.5	0.44	0.22	0.22
3.6	0.45	0.23	0.23
3.7	0.46	0.23	0.23
3.8	0.48	0.24	0.24
3.9	0.49	0.24	0.24
4	0.50	0.25	0.25
4.1	0.51	0.26	0.26
4.2	0.53	0.26	0.26
4.3	0.54	0.27	0.27
4.4	0.55	0.28	0.28
4.5	0.56	0.28	0.28
4.6	0.58	0.29	0.29
4.7	0.59	0.29	0.29
4.8	0.60	0.30	0.30
4.9	0.61	0.31	0.31
5	0.63	0.31	0.31
5.1	0.64	0.32	0.32
5.2	0.65	0.33	0.33
5.3	0.66	0.33	0.33
5.4	0.68	0.34	0.34
5.5	0.69	0.34	0.34
5.6	0.70	0.35	0.35
5.7	0.71	0.36	0.36
5.8	0.73	0.36	0.36
5.9	0.74	0.37	0.37

6. Para inyectar a las hembras la dosis total se dividió en 2 partes iguales. Primera y segunda inyección tal como se observa en la tabla.
7. Para inyectar a los machos la dosis total se aplico en una sola inyección marcada por la columna de cantidad total.

Para la dosis de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ solo se modifico el peso de la LHRHa disuelta en la solución salina, 2 mg. en 100 mL de solución salina 0.7% quedando concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Para determinar el volumen se utiliza la misma tabla que la dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$.