

Tesis de Posgrado

Algunos aspectos de la biología reproductiva de *Hoplias m. malabaricus*, (Pisces, Erythrinidae)

Matkovic, Mario

1989

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Matkovic, Mario. (1989). Algunos aspectos de la biología reproductiva de *Hoplias m. malabaricus*, (Pisces, Erythrinidae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2264_Matkovic.pdf

Cita tipo Chicago:

Matkovic, Mario. "Algunos aspectos de la biología reproductiva de *Hoplias m. malabaricus*, (Pisces, Erythrinidae)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1989. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2264_Matkovic.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

ALGUNOS ASPECTOS DE LA BIOLOGIA REPRODUCTIVA
DE Hoplias m. malabaricus (Pisces, Erythrinidae).

Lic. Mario Matković

Director: Dr. Armando Pisanó

Laboratorio de Investigaciones Embriológicas
(LABINE-CONICET)

1989

Tesis presentada para optar al título de Doctor en
Ciencias Biológicas

- 2.264 -
Ej. 2.

A Lizi,
a quienes quiero,
y a quienes me quieren.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Armando Pisanó, por haberme recibido en su laboratorio, por ser mi Director de Becas y de Tesis y por su empeño en formarme como científico.

A la Dra. Maria Cristina Maggese, quien me dio la oportunidad de hacer las "primeras armas" en la biología y por ser mi Consejera de Estudios.

A los Lic. Alberto Espinach Ros y Victor Amutio, quienes hace mucho tiempo me introdujeron en la Biología Reproductiva de peces y a lo largo de estos años aportaron valiosos consejos.

A los Sres. Travasio, De la Canal, Pasarini, Maskaluk y Yalul, pescadores de profesión, concededores de ese arte, quienes con generosidad ayudaron a hacer posible este trabajo.

En forma muy especial al personal del LABINE, con quienes realicé este trabajo. A las Dras. Dora Rengel y Marta Mariano, al Dr. Dante A. Paz, a las Sras. Rosa Spadaccini, Alba Peñaloza, Claudia Baliño, Norma Lalia y Maria Inés Valdatta. A Anita Barciulli por tener la paciencia de mecanografiar el texto y a Marcela Lacroix por su trabajo fotográfico. A mis pañeros y amigos en la tarea diaria.

A aquellos con los que comparto el tema de trabajo Mario Ravaglia y Marcela Alvarez y a mi amigo Alejandro Molero con quien siempre pude tener una buena conversación.

A mis colegas colombianos, Luis Cervantes Parra y en especial Myrian Lugo Rugeles por compartir mi trabajo.

Al personal de la Estación Hidrobiológica de Chascomús, a quien fuera su Director, Rubén Iriart, al Ministerio de Asuntos Agrarios de la Pcia. de Buenos Aires, por su apoyo y colaboración.

Al personal del Laboratorio de Embriología Animal, FCEN-UBA, Dra. Graciela Guerrero, Nora Ceballos, Graciela Rey Vazquez, Cecilia Abel, Sonia Zapata, Alberto Valcarcel, Pablo Schwarzbaum y Marcelo Hernando. Y muy en especial a mi compañero de campañas y amigo Victor Cussac, quien se encargó de la difícil tarea de conseguir vehiculos para las campañas.

A los Dres. Osvaldo Fridman, Rodolfo Kolliker, Gustavo Somoza y Cecilia Ianino y al personal del Laboratorio de Endocrí

nología, FCEN-UBA, por facilitarme algunos elementos y compartir mis inquietudes.

A los Dres. Segura, Reboreda y Muzzio por facilitarme el uso del osmiómetro.

A la Dra. Beatriz Molinari de la CONEA por facilitarme el uso del Kontron MOP-3.

A la Dra. Ana Haedo por despejarme dudas estadísticas.

A la Municipalidad de Chascomús por facilitarme el uso de balanzas de precisión durante las campañas. Al personal de la farmacia Alfonsín de Chascomús.

A todos los que colaboraron de una u otra manera a lo largo de estos años.

A las "Tarariras" por existir y cooperar sin protesta.

Al CONICET, en usufructo de cuyas becas internas se llevó a cabo esta Tesis.

A mi familia y amigos por su parte de afecto y comprensión.

A mi esposa Lizi por su apoyo constante, por su paciencia, comprensión y sobre todo por su amor.

INDICE

	Pag.
I. INTRODUCCION.....	1
1. GENERALIDADES.....	1
2. ESTADO DEL TEMA.....	7
3. OBJETIVOS.....	12
II. GAMETOGENESIS.....	14
A. ESPERMATOGENESIS.....	15
A.1. INTRODUCCION.....	15
A.2. MATERIAL Y METODOS.....	19
a. MATERIAL BIOLÓGICO.....	19
b. METODOLOGIA DESCRIPTIVA.....	20
A.3. RESULTADOS.....	23
a. MATERIAL BIOLÓGICO.....	23
b. TESTICULO.....	23
b.1. ANATOMIA EXTERNA.....	23
b.2. ESTRUCTURA MICROSCOPICA.....	25
b.3. CITOLOGIA.....	27
b.4. CICLO ANUO TESTICULAR.....	34
A.4. DISCUSION.....	42
a. ESTRUCTURA DE LOS TESTICULOS.....	42
b. CICLO DE LA ESPERMATOGENESIS.....	43
B. OVOGENESIS.....	54
B.1. INTRODUCCION.....	54
B.2. MATERIAL Y METODOS.....	57
B.3. RESULTADOS.....	59
a. ESTUDIO AL MICROSCOPIO ESTEREOSCOPICO.....	60
b. OBSERVACIONES CON MICROSCOPIA OPTICA.....	64
c. OBSERVACIONES CON MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO.....	72
d. CICLO OVARICO.....	76
B.4. DISCUSION.....	84
ASPECTOS DINAMICOS.....	88
C. LA HIPOFISIS COMO ORGANO REGULADOR.....	93
C.1. INTRODUCCION.....	93
C.2. MATERIAL Y METODOS.....	96
C.3. RESULTADOS.....	99
a. ANATOMIA.....	99
b. CARACTERISTICAS FUNCIONALES DE LA <u>PARS DISTALIS</u> PROXIMAL.....	103

C.4.	DISCUSION.....	106
D.	FACTORES AMBIENTALES Y REGULACION DE LA REPRODUCCION.....	110
D.1.	INTRODUCCION.....	110
D.2.	MATERIAL Y METODOS.....	111
D.3.	RESULTADOS.....	112
D.4.	DISCUSION.....	115
III.	ENSAYOS SOBRE LA INDUCCION DE LA MADURACION FINAL, LA OVULACION Y LA ESPERMIACION.....	119
III.1	INTRODUCCION.....	119
III.2	MATERIAL Y METODOS.....	127
a.	SELECCION DE LOS REPRODUCTORES.....	127
b.	ACCION HORMONAL EN LOS MACHOS.....	128
c.	ENVEJECIMIENTO DE LOS SPZ.....	133
d.	CULTIVO <u>IN VITRO</u> DE TEJIDO OVARICO.....	133
e.	ACCION HORMONAL <u>IN VITRO</u>	136
f.	ACCION HORMONAL <u>IN VIVO</u>	137
III.3	RESULTADOS.....	141
a.	SELECCION DE REPRODUCTORES.....	141
b.	ACCION HORMONAL SOBRE LA ESPERMATOGENESIS Y LA ESPERMIACION.....	142
c.	ENVEJECIMIENTO DE LOS ESPERMATOZOIDES.....	148
d.	CULTIVO <u>IN VITRO</u> DE TEJIDO OVARICO.....	150
e.	ACCION HORMONAL <u>IN VITRO</u>	151
f.	ACCION HORMONAL <u>IN VIVO</u>	154
III.4	DISCUSION.....	166
a.	SELECCION DE LOS REPRODUCTORES.....	166
b.	ACCION HORMONAL EN LOS MACHOS.....	168
c.	ACCION HORMONAL EN LAS HEMBRAS.....	172
d.	INDUCCION CON HIPOFISIS.....	175
IV.	CONCLUSIONES GENERALES.....	180
V.	BIBLIOGRAFIA.....	187
	PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS.....	219

I. INTRODUCCION

1. Generalidades:

El estudio de la biología reproductiva de teleósteos ha recibido durante las dos últimas décadas valiosos aportes que consignan una serie de factores comunes, pero también una inmensa variabilidad que no permite realizar generalizaciones. Hecho comprensible si se tiene en cuenta que los teleósteos abarcan a la mayoría de las 30.000 especies de peces conocidos en la actualidad y que su historia filogenética se remonta al Jurásico (Romer, 1966) habiéndose originado en el tiempo una gran diversidad de corrientes evolutivas. Algunas especies adquirieron características estructurales y fisiológicas muy particulares, configurando una notable variedad de sistemas reproductivos (Hoar, 1969). Por lo tanto consideramos que resulta de interés el estudio de especies que por su distribución geográfica, incidencia ecológica o peculiaridades, puedan contribuir a un mejor conocimiento de los hábitos y características reproductivas.

Las consideraciones teóricas que de estos estudios se desprenden, tienen variadas implicancias, ya sean filogenéticas o en las aplicaciones biomédicas o bien en acuicultura (Donaldson, 1985).

La especie en estudio, Hoplias malabaricus malabaricus (Bloch, 1794; Eigenmann y Kennedy, 1903) hasta el momento se ubica en la siguiente posición sistemática (López et al, 1987):

Clase	Osteichthyes
Subclase	Actinopterygii
Superorden	Ostrariophysii (Greenwood <u>et al</u> , 1966)
Orden	Cypriniformes (Berg, 1947)
Suborden	Characoidel
Familia	Erythrinidae (Starks, 1906; Fowler, 1950)
Subfamilia	Erythrininae (Gill, 1895)

con tres géneros:

Erythrinus (Gronow, 1754)

Hoplerythrinus (Gill, 1895)

Hoplias (Gill, 1903)

Este último género presenta cinco especies según Azevedo y Gomes (1942), con escasos caracteres morfológicos que los diferencian:

- Hoplias microlepis (Günther, 1864): Ecuador y Panamá.
- Hoplias macrophthalmia (Pell, 1902): Brasil (Río Purús, Amazonia), Cayena, Guayana Inglesa.
- Hoplias microphthalmia (Pell, 1908): Guayana Francesa.
- Hoplias lacerdae (Ribeiro, 1908): Brasil (Sao Paulo).
- Hoplias malabarica (Bloch, 1794).

Godoy (1975) reconoce sólo dos especies:

- Hoplias lacerdae (Ribeiro, 1908): Brasil (Sao Paulo)
- Hoplias malabaricus, ésta con dos subespecies que difieren por el tamaño del ojo y la coloración general:
 - H. malabaricus malabaricus (Bloch, 1794; Eigenmann y Kennedy, 1903): Bolivia, Paraguay, Uruguay, Brasil, Argentina, Venezuela, Colombia y Guayanas.

- H. malabaricus macrophtalmus (Eigenmann, 1912; Fowler, 1950): Guayana Francesa e Inglesa y Brasil (Amazonia y Río Purús).

La familia Erythrinidae se considera como la más antigua de los cypriniformes por sus caracteres osteológicos, caracterizados por un total de 655 huesos (Weitzman, 1964; Godoy, 1975).

Hoplías sp., durante toda la vida presenta dentición caniniforme que se observa desde el período larval (Azevedo y Gomes, 1942; Godoy, 1975).

Según Greenwood et al (1966) esta familia es de estirpe austroamericana, con origen en el agua dulce y distribución neotrópica ; se encuentra presente en todos sus sistemas hidrográficos (Fowler, 1950).

En Argentina se distribuye en los ambientes lénticos de: Tucumán, Cuenca del río Pilcomayo en Formosa, río Bermejo en Salta, río Dulce en Santiago del Estero, río Cuarto en Córdoba, Iberá en Corrientes, río Paraná, Uruguay, Río de la Plata, río Salado y laguna Salada Grande en Buenos Aires (Ringuelet et al, 1967).

Algunos de sus nombres comunes son: "Tara-rira" (Argentina), "Traíra" (Brasil), "Guabina" (Colombia) (Ringuelet et al, 1967).

Esta especie alcanza en la cuenca del río Salado, una talla de 62 cm, si bien ha sido citado un ejemplar de 90 cm (Ringuelet et al, 1967), en tanto que las tallas de los ejemplares brasileños son considerablemente menores: de 40 cm, 1300 gr a un máximo de 60 cm y 4100 gr

(Pinto Paiva, 1972; Godoy, 1975).

Todavía no se ha encontrado un método confiable para saber la edad de los ejemplares dado que existen dificultades en reconocer las marcas anuales en las escamas. En las especies de Brasil parecen relacionarse con la reproducción, contándose VII anillos en las escamas de ejemplares de 40 cm (Pinto Paiva, 1972); en Chascomús, en cambio, se ha registrado 1 solo anillo para tallas de 120-245 mm, 2 anillos en los de 270-395 mm; 3 anillos en los de 370-495 mm y 4 anillos en los de 450-510 mm, que se presentarían en función del paso del período invernal (Ramírez, 1963 a).

La importancia ecológica de esta especie reside en un conjunto de factores:

a) La capacidad de adaptación a distintos ambientes, lo que determina su amplia distribución geográfica (Panamá - Sur de Buenos Aires); inclusive, introducida en Florida (USA), ha llegado a reproducirse y a colonizar amplias zonas (Hensley y Moody, 1975; Hensley, 1976).

b) La elevada capacidad de dispersión que presentan los juveniles, capaces de sortear obstáculos saltando o arrastrándose sobre ellos y su notable voracidad (Azevedo y Gomes, 1942; Pinto Paiva, 1972).

c) Los bajos requerimientos de oxígeno (en general un 30-40% menor del que utilizan otras especies con las que conviven) junto con la resisten-

cia a niveles mínimos de oxígeno (nivel de oxígeno letal: 0,30-0,80 ppm) y una óptima capacidad de recuperación (Parma de Croux, 1983 a y b) hacen que se adapten a condiciones hidrológicas anormales. En términos de biomasa se torna una de las especies más importantes en charcas y lagunas con variaciones estacionales marcadas, o casualmente aisladas y en vías de desecación (Pinto Paiva, 1972; Godoy, 1975; Bonetto et al, 1969).

d) Alimentación: clasificado como generalista (Lowe, 1964), durante la fase adulta, se presenta como predador ictiófago y, ocasionalmente, ingiere crustáceos. Resulta incorrecta su fama de voraz, ya que estudios ictiológicos han encontrado en el 58% de los ejemplares, estómago vacío y en los que presentaban alimento solo una clase de presa por ingesta (Pinto Paiva, 1972).

Los alevinos (postlarvales - juveniles), primero planctófagos, pasan a ser insectívoros y finalmente ictiófagos; si bien su voracidad es muy notable, también ha sido señalado un sólo tipo de alimento por ingesta (Pinto Paiva, 1972)

Especialmente los ejemplares adultos de esta especie se muestran muy resistentes a la falta de alimento (Pinto Paiva, 1972; Godoy, 1975).

e) Hábitat: generalmente cuerpos de agua lénticos (raramente lóticos), vegetados y de profundidad variada, tanto sujetos a estres hídrico como permanentes, tolerando también cambios de salinidad (Azevedo y Gómez, 1942; Pinto Paiva, 1972; Godoy, 1975).

f) Reproducción: si bien la fecundidad no parece ser elevada (46.000 ovocitos en un ovario de 42 g, proveniente de una hembra de 39 cm y 1200 g), el carácter parcelado de los desoves permite incrementar la probabilidad de supervivencia (Moreira, 1921; Azevedo y Gómes, 1942; Pinto Paiva, 1972; Hensley y Moody, 1975).

La época reproductiva se verificaría durante la temporada de lluvias por lo menos en el NE de Brasil (Pinto Paiva, 1972; Godoy, 1975). El aspecto tal vez más importante es el cuidado parental de las crías ya que el casal construye un nido (depresión de 20 cm de diámetro) donde desovan. Luego el macho cuida y ventila el nido con las aletas pectorales, hasta que las larvas comienzan a alimentarse (total de 10 días) (Azevedo y Gómes, 1942; Ramirez, 1963 b; Pinto Paiva, 1972; Godoy, 1975).

Al respecto, Hensley y Moody (1975) opinan que "si se toma como criterio para estimar el éxito para adaptarse, a la abundancia y a la amplia distribución, se puede afirmar que esta especie lo es. La alimentación generalista, plasticidad en la época reproductiva en distintas zonas, cuidado de la cría, diverso rango de hábitat y sobrevida a condiciones adversas y de hambruna lo hacen posible".

En Argentina la tararira es consumida, en la actualidad, en los mercados de las lagunas encadenadas del río Salado en forma de filete. El desarrollo, por parte de los pescadores, de una técnica que permite obtener excelente carne sin espinas, ha determinado que esta especie,

antes desperdiciada, adquiriera un valor económico todavía insospechado. El peso muscular es del 58% del total, en tanto que por el faenado se obtiene un 30%.

En Brasil, esta especie es consumida e incluso se efectúa su piscicultura en los extensos "açudes" del NE. Además es recomendada por la FAO, entre otras especies regionales, para el estudio más profundo de sus hábitos alimenticios, crecimiento, reproducción, ecología y como potencialmente apta para la intensificación y extensión de su cultivo (Nomura, 1974).

2. Estado del tema:

Reproducción en *H.m.malabaricus*

No se han detectado ni dimorfismo sexual, ni variaciones externas que indicaren el grado de maduración de los ovarios; en cuanto a los ejemplares machos, sólo en el máximo de fluidez de su semen, pueden emitir una gota cuando son estimulados por masajes abdominales (Azevedo y Gómez, 1942; Pinto Paiva, 1972; Godoy, 1975). Esta falta de parámetros adecuados dificulta la selección de reproductores.

Azevedo y Gómez (1942) han descripto a los testículos, macroscópicamente, como de forma acintada y sin irrigación periférica. Histológicamente, Pinto Paiva (1972) ha observado, aparentemente, una capa muscular y una capa conectiva, caracterizando someramente a las espermatogonias (SPG), espermatocitos (SPC), espermatidas (SPD) y

espermatozoides (SPZ). Este autor ha descrito además dos estadios de maduración testicular: 1º) inmaduros: filiformes, sin SPD ni SPZ y 2º) maduros: fusiformes, de sección redondeada, con SPD y SPZ, encontrando diferencias en el índice gonadosomático (IGS) de ejemplares brasileños de 0,1 en el primer estadio y 0,5 en el segundo (Pinto Paiva, 1972). Según este mismo autor, los machos madurarían después del primer año de vida (largo total (LT): 170-230 mm) en tanto que Godoy (1975) afirma que lo hacen después del segundo año. Calvo et al (1966) no observaron variaciones en el IGS en distintas épocas del año, a la vez que hallaron espermatozoides con motilidad durante todo el ciclo. La motilidad de los SPZ osciló entre 5 y 20 minutos (Azevedo y Gómes, 1942).

En la bibliografía se señalan tres descripciones de la escala de maduración de los ovarios (Calvo et al, 1966; Pinto Paiva, 1972 y Caramaschi et al, 1982) (Tabla 1) que presentan características en común, salvando las diferencias de criterio entre los distintos autores en la **diagnos**is de los elementos celulares. En esta tabla hemos intentado homologar con fines comparativos los cuadros descriptos por esos autores, adaptandolos, en base a las características funcionales y de tamaño, a la nomenclatura empleada en el presente trabajo. De esta manera: los ovocitos II (u OII) corresponden a los previtelogénicos basófilos; los ovocitos III (u OIII) presentan vesículas vitelinas (o corticales); los ovocitos IV (u OIV) son los correspondientes al inicio de la vitelogénesis; OV: formación de plaquetas vitelinas; OVI: completamente vitelados y OVII: migración

Calvo et al (1966) Argentina (Chascomús)	Pinto-Paiva (1972) Brasil (Nordeste)	Caramaschi et al (1982) Brasil (São Paulo)	Matkovic (este trabajo) Argentina (Chascomús)
PREMADUREZ VIRGINAL NO DESCRIPTO	INMADUROS Peso ovarios: 0,7gr blanco-rosados	JOVEN O II tempranos, O II. casi transparentes	NO DESCRIPTO
PRE-MADURACION OII, OIII, OIV Sección sub-triangular. Amarillo claros IGS: 0,79	EN DESARROLLO Peso ovarios: 3,1gr Amarillentos	MADURACION OII, OIII. Sección sub-triangular Amarillo claros IGS: 0,4-0,7 Febrero-Marzo	PREVITELOGENESIS OII, OIII, OIV Crecimiento 1º y formación de alvéolos cortic. Blanco-Amarillentos IGS: hasta 0,5 Mayo-Julio
PRINCIPIO DE LA MADURACION OII, OIII, OIV, OV, OVI. Sección triangular Amarillo oscuros IGS: 2,93 Septiembre-Octubre		OII, OIII, OIV, OV, OVI. sección triangular Anaranjados IGS: 2,5-5 Septiembre-Octubre	VITELOGENESIS OII, OIII, OIV, OV, (OVI). sección triangular Amarillo claros IGS: 1-1,5 Julio-Septiembre
MADURACION AVANZADA OII a OVII Sección circular Beige amarillento IGS: 9,35 Noviembre	MADUROS OII a OVII Sección circular Naranja fuerte Peso ovarios 13,1gr	MADURO OIII a OVII Sección circular Anaranjados IGS: 12 Sept/Oct-Diciembre	VITELOGENESIS ACTIVA OII a OVI Sección circular Amarillos IGS: 2-3 Septiembre-Enero
MADUROS NO DESCRIPTO Diciembre- Enero			MADURACION FINAL OII a OVII Sección circular Amarillo-naranja IGS: 3-16 Noviembre-Febrero
POST-DESOVE OII, OIII, OV, OVI Folículos vacíos y Atresias. Sección subtriangular Naranja borraño IGS ~ 1,9 Diciembre		SEMIDESOVDOS OII, OIII, OIV, OV Folículos vacíos IGS ~ 0,7 Diciembre-Febrero	SEMIDESOVDADO OII a OVII, Folículos vacíos y Atresias Sección subtriangular o circular IGS: 3-5 Noviembre-Marzo
REGRESION OVARICA OII a OV Sección subtriangular Blanco-rosados IGS: 0,63 Marzo	DESOVADO Atresias Sección subtriangular Peso ovarios 7,4gr	DESOVADO OIII, Folículos vacíos Enero-Abril	DESOVADO OII a OVI, Folículos vacíos, Atresias Sección subtriangular o triangular IGS: 0,5-1,5 Noviembre- Mayo

Tabla 1: Comparación entre las escalas de maduración de los ovarios de H. m. malabaricus.

de la vesícula germinal.

En base a la comparación efectuada, se observa que el estado joven o inmaduro se encontraría fuera del ciclo anual, correspondiendo a ejemplares que no han alcanzado la primera maduración. Los estadios de Pre-maduración y Principio de maduración, según Calvo et al (1966), equivalen al estadio de Maduración descrito por Caramaschi et al (1982) y éste equivaldría al de Desarrollo propuesto por Pinto Paiva (1972); el estadio de Maduración avanzada señalado por Calvo et al (1966) equivale parcialmente al Maduro de Caramaschi et al (1982). En tanto, el Maduro de Pinto Paiva (1972) corresponde a estos dos últimos estadios, más el Semidesovado o de Post-desove. Según Caramaschi et al (1982) la existencia del estadio semidesovado sería descriptivo del ciclo de H.m.malabaricus definiendo su carácter de desovante parcial. Los estadios desovados son equivalentes y no es clara su relación con el estadio de regresión ovárica de Calvo et al (1966). (Tabla 1).

La fecundidad en localidades del NE brasileño se ha estimado en 46.000 ovocitos en un ovario de 42 g correspondiendo a una hembra de 390 mm de largo total (LT) y 1200 g de peso total (Wt) (Pinto Paiva, 1972). En tanto que en Chascomús, en una hembra de 400 mm de LT, con ovarios de 47 g, fueron señalados solo 37.500 ovocitos (Ramirez, 1963 a).

Los ovocitos maduran progresivamente, resultando desoves parciales a intervalos de quince días, cada uno constituido por aproximadamente 2500 ovocitos (Pinto

Paiva, 1972). Esta característica es relacionada, por ese mismo autor, con más de un anillo difuso como marca anual en las escamas.

El desove, en el nordeste brasileño, se extiende durante todo el año, siendo más importante durante el primer y segundo trimestre que corresponden a la época de mayores precipitaciones (Pinto Paiva, 1972); según Godoy (1975) habría una correlación temporal entre el desove y las lluvias. En São Paulo el desove se efectúa durante diciembre-febrero (Caramaschi et al, 1982). En Argentina, Calvo et al (1966), sitúan la reproducción en Chascomús entre noviembre-febrero; Ramirez (1963), para la misma localidad, en noviembre-diciembre y Ringuélet et al (1967) de setiembre a octubre.

La primera maduración de las hembras se verificaría, si bien en forma poco fiable, después del primer año (Azevedo y Gómez, 1942; Pinto Paiva, 1972) o en el tercer año (Godoy, 1975) para ejemplares brasileños.

La proporción de sexos en Chascomús, según un análisis preliminar, fue de 50:50 (Calvo et al, 1966).

Azevedo y Gómez (1942) describen con detalle la conducta en etapas previas y durante el apareamiento; es de destacar que los ovocitos son desovados en grupos de aproximadamente sesenta e inmediatamente fertilizados dentro de un canal que forma la hembra con su aleta anal sobre la papila urogenital del macho.

El desarrollo ontogenético de la especie ha sido objeto de una descripción externa (Azevedo y Gómez,

1942): con temperaturas de 21°C el desarrollo embrionario se extiende por 52 hs; el sexto día después de la eclosión se observa que el saco vitelino se reabsorbe y que las larvas comienzan a alimentarse; a los 2,5 meses los ejemplares se consideran juveniles y cerca del primer año (15-20 cm de largo total) las hembras **presentan ovocitos en estadios avanzados.**

H.m,malabaricus, según trabajos técnicos de la C.T.P. brasileña de 1934-1939 compendiados por Azevedo y Gómes (1942), puede ser inducido a desovar con hipófisis. Los varios autores han usado dosis crecientes sucesivas de 1/8 a 1 hipófisis/animal inyectadas en intervalos cortos (4 hs 30') utilizando hipófisis frescas o conservadas en glicerina, de donantes en pre-estro, sin aclarar la especie. La selección de reproductores para estos ensayos fue efectuada recolectando ejemplares que se hallaban formando el nido, es decir con conducta reproductiva. Los machos en todos los casos fueron sacrificados y sus testículos macerados para los procesos de fertilización (Azevedo y Gómes, 1942; Godoy, 1975).

3. Objetivos:

El propósito de este estudio es analizar algunos aspectos de la biología reproductiva de H.m,malabaricus.

- La primera etapa, descriptiva, examina los procesos de gametogénesis, su relación con la hipófisis como órgano regulador y compara el ciclo reproductivo con los factores ambientales.

- La segunda, experimental, describe la acción que poseen algunos agentes hormonales sobre la maduración final (in vitro e in vivo), la ovulación y la espermiación, con el objeto de obtener desoves viables.

El desarrollo de la obra, para su mejor comprensión, se ha dividido en capítulos que consideran a cada uno de los objetivos.

II. GAMETOGENESIS

La gónada de los ciclostomos y teleósteos, a diferencia de la de los otros Vertebrados, carece del área medular; por lo tanto se responsabiliza al estroma que la constituye denominado "cortex", la formación del ovario o, respectivamente, del testículo. Esa peculiaridad ha sido considerada como posible factor de la intersexualidad en el grupo de los peces (Hoar, 1969). Si bien son principalmente dioicos, se presenta con relativa frecuencia el hermafroditismo (Nagahama, 1983).

La organización morfológica de las gónadas de varias especies de teleósteos ha sido estudiada tanto a nivel de microscopía óptica como así también ultraestructural, reconociéndose, a pesar de la diversidad, un plan básico uniforme (Hoar, 1969; Nagahama, 1983) que simplifica en parte el estudio anatómico.

El estudio de la espermatogénesis, la ovogénesis, la hipófisis como órgano regulador y de la relación del ciclo reproductivo con factores bióticos y abióticos, abarca cada uno un capítulo distinto y hemos creído conveniente separarlos en unidades independientes para su mejor comprensión.

A. ESPERMATOGENESIS

A.1 INTRODUCCION

La organización de los testículos de teleósteos responde a una estructura básica común. Son en general, pares, poseen gonoductos y una organización peculiar. En efecto, según la especie, en el testículo se reconocen túbulos o bien lóbulos seminíferos, que confluyen en conductos de mayor tamaño, hasta llegar a un ducto deferente principal (Grier, 1975; Billard, 1986).

Por lo general el sistema urinario y el reproductor desembocan independientemente, existiendo excepciones e incluso cloacas verdaderas (Romer, 1966).

La forma del testículo es muy variada, de acintada a globular y, en general, su organización es homogénea (Hoar, 1969; Nagahama, 1983), si bien en algunas especies se presentan zonas especializadas, glandulares (Fam. Ictaluridae, Sneed y Clemens, 1963) o de almacenamiento (H. seenghala y R.rita, Shesta y Khanna, 1978).

Se distinguen dos tipos de testículos según la ubicación del tejido germinal:

a) tipo lobular o de espermatogonias no restringidas: típico de la mayoría de los teleósteos. Está caracterizado por lóbulos seminíferos rodeados por tejido conectivo; en el espesor de las paredes lobulares se desarrollan numerosos cistos conteniendo los elementos de la serie espermática. El desarrollo de la espermatogénesis se verifica in situ; los espermatozoides son expulsados al lumen lobular,

desde donde alcanzan a los eferentes (Belsare, 1966; Nayyar y Sundararaj, 1970; Nichols y Graham, 1972; Nagahama, 1983).

Las paredes lobulares se encuentran tapiadas por células planas semejantes a las células cistales. Todo el desarrollo de la espermatogénesis se verifica en cistos constituidos por células cistales (también denominadas de Sertoli, Lofts y Bern, 1972) y por células germinales reunidas en grupos isógenos; es característica la sincronía de su evolución. Entre las células germinales se observan puentes citoplasmáticos (Nagahama, 1983) análogamente a lo que ocurre en la mayoría de las especies animales (Courot et al, 1970)

b) tipo tubular o de espermatogonias restringidas: es típico de los Atheriniformes. Las espermatogonias se encuentran agrupadas en cistos situados en el extremo ciego de los túbulos (en la periferia de la gónada). Durante la espermatogénesis, los cistos migran en forma progresiva hacia la zona medular en la que se liberan los espermatozoides o bien los espermatóforos (Billard, 1969; Hyder, 1970; Gresik et al, 1973; Grier, 1973, 1975; Grier et al, 1978; Russo y Pisanó, 1973; Gardiner, 1978; Billard et al, 1982).

Tanto los lóbulos como los túbulos están separados por septos de tejido conectivo (Belsare, 1966; Nayyar et al, 1970; Grier, 1975) aunque se ha mencionado en algunos casos la presencia de fibras musculares lisas con posible incidencia en la espermiación (Gresik, 1973; Ruby y Mc Millan, 1975; Gardiner, 1978; Aoki y Gutierrez, 1978; Arriaga, 1981).

La renovación de las espermatogonias (SPG) en ambos tipos de testículo se efectúa por medio de las células basales (o troncales) denominadas STEM CELLS (Roosen Runge, 1977; Grier, 1981) de ubicación generalmente periférica en los lóbulos seminíferos, y apical en los túbulos, aunque se le ha atribuido también un origen intersticial por lo menos en Palmo gairdneri y en Culaea inconstans (Van den Hurk et al, 1978; Ruby y Mc Millan, 1975).

Se reconocen varios estadios durante la espermatogénesis y la espermiogénesis caracterizados por el aspecto nuclear y citoplasmático.

Las espermatogonias (SPG) presentan varios tipos: en general la SPG A corresponde a la célula germinal de mayor diámetro, con núcleo en interfase, aislada y rodeada por células cistales, asociada usualmente con la STEM CELL. El número de tipos subsiguientes varía según los autores, reconociéndose una SPG B de menor diámetro que la primera, también aislada y luego SPG C agrupadas en acúmulos formando un cisto. En las etapas sucesivas se encuentran los espermatocitos (SPC) y las espermatidas (SPD). Durante la espermiogénesis éstas últimas se diferencian en espermatozoides (SPZ) dentro de los cistos, sin que medie una asociación celular con las células de Sertoli (Nagahama, 1983). Los espermatozoides presentan casi siempre cabeza esferoidal (sin acrosoma) y pieza media corta (Grier, 1981). Las especies en las que la fecundación es interna, poseen espermatozoides con cabeza elongada (Dadone y Narbaiz, 1967; Grier, 1973, 1975; Russo y Pisanó, 1973; Nagahama, 1983).

El desarrollo de la espermatogénesis si bien es morfológicamente diferente al que ocurre en Mamíferos (Courot et al, 1970), posee similitudes funcionales. En peces, una barrera hemato-testicular permite mantener un medio intracistal particular (Marcaillou y Szöllösi, 1980; Abraham et al, 1980; Parmentier et al, 1985). En Mamíferos, en cambio, las células de Sertoli crean compartimientos para el desarrollo de las células germinales (Dym y Fawcett, 1970).

La espermiación estaría en relación con la hidratación del líquido seminal, proceso hormona-dependiente, vehiculizando los espermatozoides al vas deferens (Billard et al, 1982).

El tejido intersticial presenta abundante irrigación, tejido conectivo y células productoras de esteroides. Estas últimas se suelen considerar homólogas a las células de Leydig de los Vertebrados superiores (Hoar, 1969; Follenius, 1968; Nagahama, 1983) ya que poseen análogas características ultraestructurales (Gresik et al, 1973; Arriaga, 1981) y las enzimas ligadas a la producción de esteroides (3 β HSD) (Chieffi y Botte, 1964; Yaron, 1966; Yamazaki y Donaldson, 1969; Van den Hurk et al, 1978 a y b).

Eventualmente las células de Sertoli también tienen función esteroidogénica como en Cymatogaster aggregata (Wiebe, 1969), Fundulus heteroclitus (Bara, 1969) y en Salmo gairdneri (Van den Hurk et al, 1978 a y b).

En este capítulo se estudian las distintas poblaciones celulares en sus aspectos anatómicos y dinámicos.

A.2 MATERIAL Y METODOS

a) Material biológico

Los ejemplares de H.m.malabaricus proceden de las lagunas del sistema de las Encadenadas de la cuenca del río Salado (Provincia de Buenos Aires) tomando como centro de referencia a la localidad de Chascomús (35° 45'S, 58° W). La captura fue realizada mensual o quincenalmente por pescadores comerciales, mediante el uso de red de enmalle o espinel, entre los años 1983-1988.

Los ejemplares fueron mantenidos en jaulas cercanas a la costa, por lapsos casi siempre no mayores de tres días, hasta su traslado al laboratorio. Este se realizó en bolsas de polietileno, con agua y atmósfera de oxígeno, colocadas en recipientes plásticos para evitar en los ejemplares eventuales traumatismos o roturas de las bolsas.

En el laboratorio los animales fueron acondicionados en acuarios de 100 lts. El mantenimiento se efectuó en agua al 3‰ de salinidad con recambios parciales día por medio y aireación por burbujeo. Los ejemplares no fueron alimentados. Las heridas, pérdidas de escamas y micosis fueron controladas por medio del agua salobre y con el uso de productos farmacéuticos antisépticos (Pervinox crema y Merthiolate, solución).

En ocasiones el muestreo se efectuó en el lugar de la captura por no contar con medios de transporte.

b) Metodología descriptiva

La rutina de muestreo fue en todos los casos similar:

- anestesia de los ejemplares con benzocaina 100 ppm o aturdimiento por golpe.
- determinación del largo total y standard.
- determinación del peso total.
- corte de la cabeza con un alicate robusto.
- remoción de las gónadas, pesado y fijación.
- extracción de la hipófisis y fijación.

b.1) Testículo

Las muestras de los testículos, fijadas en líquido de Bouin (Martoja y M. Pierson, 1970) por 24 hs y conservadas en alcohol 70º fueron procesadas para obtener cortes seriados de 5 µm en parafina-cera de abejas. Se utilizó como coloración general a la hematoxilina de Ehrlich - eosina y al tricrómico de Masson (Martoja y M. Pierson, 1970).

Muestras de testículos fijadas en Bouin, formol calcio o en solución de Mc Manus-Baker, fueron procesadas para obtener cortes histológicos de congelación o en parafina, según la técnica usada, con el objeto de detectar:

- colesterol y sus ésteres: (S) método de Shultz
- fosfolípidos: (SB) método de Mc Manus-Baker
- glicosaminoglicanos ácidos: (AB) alcian blue pH 2,5
- glicosaminoglicanos neutros: (PAS) ácido periódico de Schiff.

- proteínas: (MA) mercurio-azul de bromofenol
- ácidos nucleicos: (E) técnica de Linardson
- tejido conectivo y músculo liso: tricrómico de Cajal-Gallego. (Martoja y Martoja Pierson, 1970; Troyer, 1980; Locquin y Langeron, 1985; Pearse, 1985).

Las observaciones se efectuaron al microscopio óptico realizando mediciones de los tamaños celulares, por medio de un ocular micrométrico. Para el reconocimiento de los distintos elementos de la serie espermática, se consideraron las características nucleares y citoplasmáticas que se suelen señalar al respecto.

Cortes histológicos de 5 μm , teñidos con hematoxilina-eosina, fueron examinados a 400 aumentos. Se han medido las áreas ocupadas por los cistos que respectivamente encierran los diferentes elementos celulares de la espermatogénesis y el área ocupada por el tejido intersticial. Se registró además el número de células de Leydig y la densidad de espermatozoides en el lumen lobular. Estas mediciones, efectuadas usando ejemplares de distintas muestras mensuales, se realizaron proyectando la imagen microscópica con una cámara clara sobre la placa magnética de un sistema de medición Kontron MOP3 Zeiss (facilitado por la CONEA). Los resultados fueron expresados en μm^2 y en porcentajes respecto de un área total de 89.000 μm^2 , que fue medida en 5 campos diferentes dentro de la zona central del testículo de distintos cortes tomados al azar. Esta cantidad fue considerada suficientemente representativa.

Se efectuaron recuentos del número de célu-

las de Leydig presentes dentro de un retículo micrométrico de $625 \mu\text{m}^2$, con el fin de obtener una estimación del volumen de estas células en distintos períodos del año. Las observaciones se efectuaron teniendo en cuenta veinte campos microscópicos diferentes por muestra; al respecto hemos cuidado que el retículo abarcara zonas con solo células de Leydig. Se calculó el área = $625 \mu\text{m}^2 / \text{No de células}$ utilizándola como estimador del volumen.

Las tres clases de espermatogonias (SPG A, B y C) fueron contadas en cinco lóbulos espermáticos de tamaño comparable entre sí (a 400 X) en los distintos ejemplares.

Una estimación de la cantidad de espermatozoides (SPZ) que llenan la luz de los conductos eferentes y los lóbulos espermáticos fue obtenida mediante el examen de las muestras mensuales, utilizando una escala objetiva: 0: vacío - 25% ocupado por SPZ; 1: 25-50% ; 2: 50-75%; 3: 75-100%. En función de su diámetro, los lóbulos espermáticos se reconocieron como: pequeños, 0; medianos, 1; grandes, 2.

El índice gonadosomático (IGS) fue obtenido mediante la relación:
$$\text{IGS} = \frac{\text{WG}}{\text{WT} - \text{WG}} \cdot 100$$
 donde WG = peso de la gónada y WT = peso total del ejemplar.

Los resultados fueron estadísticamente controlados mediante Anova. (Sokal y Rohlf, 1969).

A.3 RESULTADOS

a) Material biológico

De los 777 ejemplares capturados entre 1983-1988, 402 han sido hembras (52%), 365 machos (47%) y 10 juveniles, lo que sugiere que la proporción de sexos, de la población estudiada de H.m.malabaricus es de aproximadamente 50:50.

Las tallas de los ejemplares han oscilado entre 315 mm y 635 mm de largo total, correspondiendo un promedio de 456,5 mm a las hembras y de 461,9 mm a los machos. Los pesos corporales se han registrado entre 400 g y 3350 g, correspondiendo un promedio de 1259,7 g a las hembras y de 1322,9 g a los machos. Se ha comprobado que ambos parámetros correlacionan, relacionados por una función potencial $W = 56,12 \cdot L^{1,34}$ con un $r = 0,96$ para los machos y $W = 59,52 \cdot L^{1,33}$, $r = 0,95$ para las hembras.

b) Testículo

b.1) Anatomía externa:

Son órganos pares, ubicados a ambos lados de la vejiga natatoria, ocupando toda la longitud de la cavidad general del cuerpo (fig. 1). El aspecto es filiforme, de bordes lisos y no refleja variaciones relacionadas con el ciclo anual. El diámetro de cada testículo es uniforme (1-3 mm) salvo a la altura de la constricción que divide la vejiga natatoria, área en la que se engrosa notablemente.

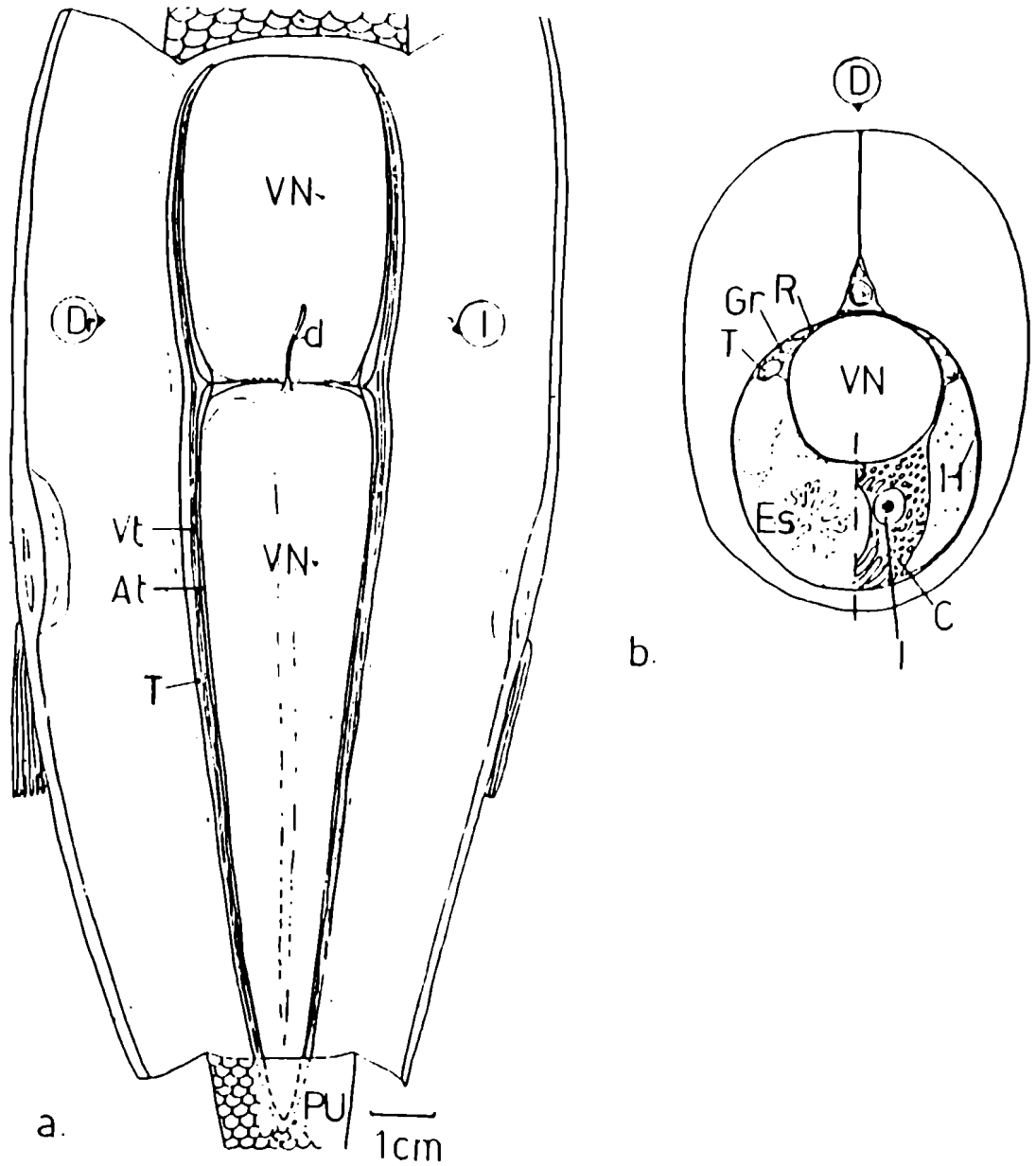


Fig. 1: a) Esquema de la posición de los testículos en la cavidad general del cuerpo. Todos los órganos que los recubren han sido removidos. Vista ventral. b) Corte transversal de un ejemplar macho. Ref: Arteria Testicular (AT); Ciegos pilóricos (C); Ductus (d); Estomago (Es); Grasa (Gr); Hígado (H); Papila Urogenital (PU); Riñon (R); Testículo (T); Vejiga Natatoria (VN); Vena Testicular (VT); Dorsal (D) ; Derecha (Dr) ; Izquierda (I) 1X.

La porción más cefálica del testículo se encuentra adosada al tabique de la cavidad pericárdica, la más caudal en cambio penetra en la pared muscular en donde ambos testículos, respectivamente, se unen con el conducto urinario, desembocando en la papila orogenital.

La superficie dorsal de la gónada se encuentra recubierta por abundante tejido adiposo. En la faz ventral, hacia la cavidad general del cuerpo, corren la arteria y la gran vena testicular (fig. 1).

b.2) Estructura microscópica:

La pared formada por la túnica albugínea consta de una gruesa capa de tejido conectivo denso con fibras colágenas y vasos sanguíneos; el todo se encuentra recubierto, externamente, por la serosa del peritoneo (fig. 2).

La organización del testículo es "lobular", disponiéndose los lóbulos en forma radial al eje mayor del órgano y anastomosándose en diferentes niveles, formando una estructura intrincada. Estos lóbulos desembocan en "ductos eferentes" dorsales, de disposición longitudinal (fig. 3). Esta organización se mantiene desde el extremo proximal, variando solo el número de ductos eferentes dorsales, que se incrementa hacia las secciones más caudales. En el extremo distal se pierde la disposición radial de los lóbulos, tornándose éstos longitudinales al eje mayor del testículo; a la vez que los ductos eferentes se fusionan en conductos cada vez mayores hasta que forman respectivamente un ducto defe-

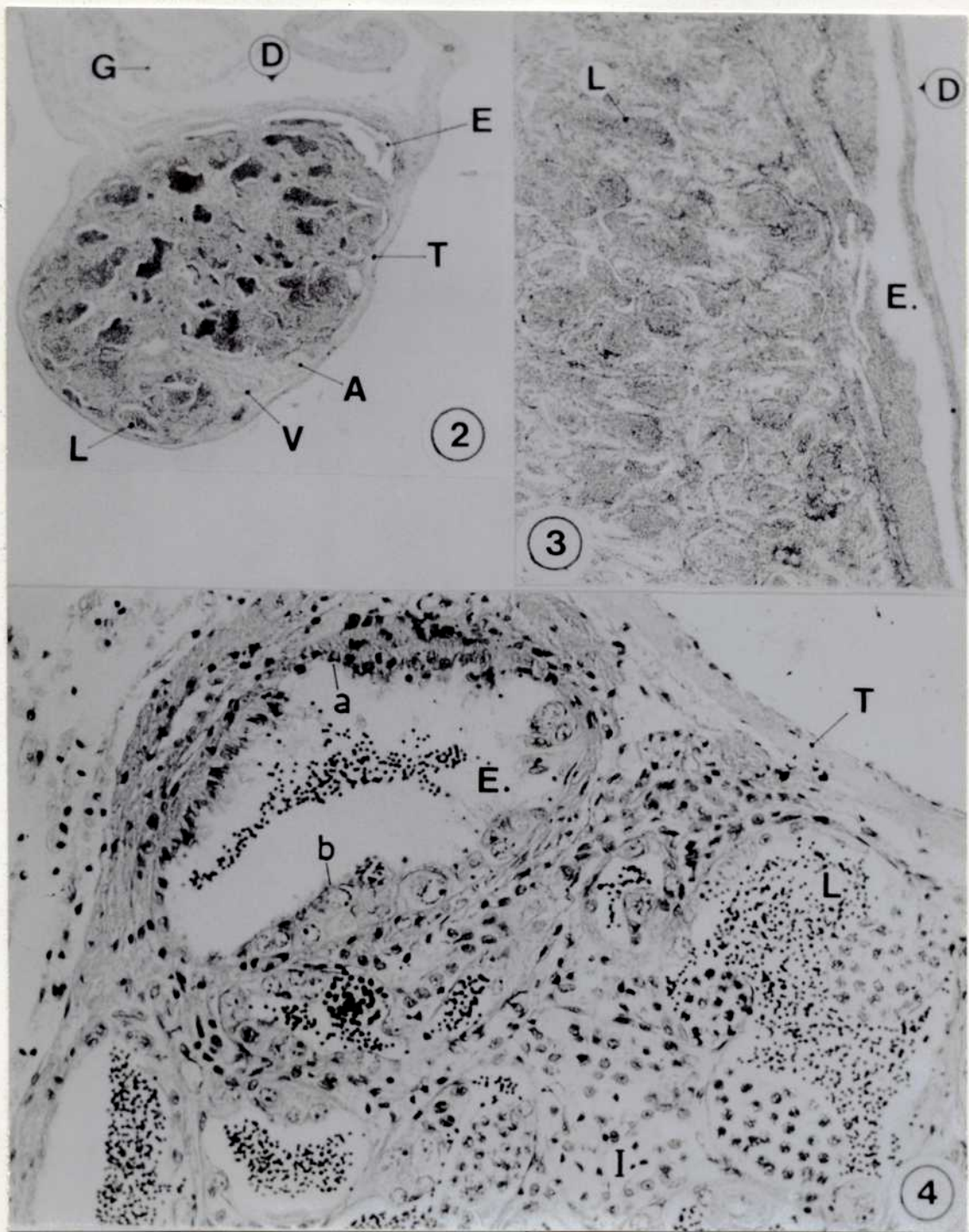


Fig. 2: Corte transversal de testículo. 32X, HE. Fig. 3: Corte sagital de testículo. 150X, TM. Fig. 4: Ducto eferente y lóbulos seminíferos, período reproductivo. 400X, HE. Ref: Arteria testicular (A); Pared ventral del ducto eferente (a); pared dorsal del ducto eferente (b); Ducto eferente (E); Grasa (G); Intersticio interlobular (I); Lóbulillo seminífero (L); Túnica albugínea (T); Vena testicular (V); Dorsal (D).

rente. Ambos ductos deferentes se unen a los lados del conducto urinario desembocando en forma conjunta en la papila urogenital.

Rodeando a los lóbulos se encuentran una o dos capas de células perilobulares y tejido conectivo. En contacto con la membrana basal el análisis microscópico señala células cistales (o de Sertoli), algunas de las cuales forman las paredes de los lóbulos y ductos, mientras otras constituyen los cistos en los que se verifica la espermatogénesis y sucesivamente la espermiogénesis (fig. 4).

El ducto deferente presenta epitelio plano o cúbico con prolongaciones citoplasmáticas notables y, al menos en los períodos de actividad reproductiva, células glandulares.

Los espacios interlobulares son estrechos; en los sitios donde se tocan tres o más lóbulos, los espacios se ensanchan presentando capilares, fibrocitos, células de Leydig (fig. 4) y en ocasiones, según parece, haces de músculo liso.

b.3) Citología:

Las características citológicas y merísticas de todos los elementos celulares se condensan en la tabla 2.

- Espermatogonias tipo A (SPG A) (Fig. 5): son las células germinales más voluminosas del testículo (\varnothing : 12,96 μ m); de forma esferoidal, se encuentran aisladas o en cistos formados por no más de 2 células y rodeados por

CARACTERÍSTICA	SFC A	SFC B	SFC C	SFC 1	SFC 2	SFC	SERIE	LEYENDA	REPLICAS	COMENTARIOS
ESTADOCIGACION	ASISLADAS	ASISLADAS	EN CISTOS DE 2 A 8 CELULAS	GRANDES CISTOS	GRANDES CISTOS	GRANDES CISTOS	FORMAS CISTOS Y EFECTOS DE LOCALAR	POBLACIONES INTERLOBULARES	INTERLOBULARES	INTERLOBULARES DISPERSAS EN LA ALBUGINEA
FORMA CELULAR	ESFERICA	POLIEDRICA ESFERICA	POLIEDRICAS	NO SE DISTINGUEN LOS LIMITES CELULARES			MUY VARIADA	POLIEDRICA	PUSIFORME	IPOLIEDRICA MUY VARIADA
DIAMETRO CELULAR	R: 22,96µm	R: 9,36µm	NO SE PUEDE PRECISAR POR CAUSA DE LA INDEFINICION DE LOS LIMITES CELULARES	ESFERICA	ESFERICA	ESFERICA	MUY VARIADA	DIFUSIVA	INDISTINGUIBLE	R: 5,5µm, 3µm
FORMA NUCLEAR	ESFERICA	ESFERICA-OVAL	ESFERICA-OVAL	ESFERICA	ESFERICA	ESFERICA	VARIADA	ELIPTICA-ESFERICA	PUSIFORME	ELIPTICA-ESFERICA
DIAMETRO NUCLEAR	R: 6,39µm	R: 6,22µm	R: 6,4µm	R: 4,8-5,6µm	R: 7,8-3,6µm	R: 7,7-2,4µm	R: 2,4-8µm	R: 4µm, 4µm	R: 6,8µm	R: 2,4µm, 2µm
CROMATINA	GRANULOS PERIFERICOS E INTERMEDIOS Y NUCLEOLOS CENTRALES	GRANULOS PERIFERICOS E INTERMEDIOS Y NUCLEOLOS CENTRALES	GRANULOS PERIFERICOS E INTERMEDIOS Y NUCLEOLOS CENTRALES	GRANULOS PERIFERICOS E INTERMEDIOS Y NUCLEOLOS CENTRALES	GRANULOS PERIFERICOS E INTERMEDIOS Y NUCLEOLOS CENTRALES	GRANULOS PERIFERICOS E INTERMEDIOS Y NUCLEOLOS CENTRALES	CARACTERISTICA BIEN DEFINIDA, GRANULOS FINOS Y HETEROCENTROS	CARACTERISTICA BIEN DEFINIDA, GRANULOS FINOS Y HETEROCENTROS	CARACTERISTICA BIEN DEFINIDA, GRANULOS FINOS Y HETEROCENTROS	CARACTERISTICA BIEN DEFINIDA, GRANULOS FINOS Y HETEROCENTROS
CARIOPLASMA	CROMOFORO	CROMOFORO	CROMOFORO	CROMOFORO	BASOFILO	BASOFILO	BASOFILO	BASOFILO	BASOFILO	BASOFILO
NUCLEOLO	1-2	1-2	1-2	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN (?)
DIAM. NUCLEOLO	R: 2,19µm	R: 1,6µm	R: 1,62µm					R: 1,2µm		
CITOPLASMA	POCO CROMOTILO	POCO CROMOTILO CON GRANULOS BASOFILOS	CROMOFORO	CROMOFORO	NO SE DISTINGUE	NO SE DISTINGUE	DESCAMANTE DISTINGUIBLE SIN INCLUSIONES	ALGO CROMOTILO C/GRANULOS	C/GRANULOS	CROMOFORO C/ML, GRANULOS GROSOS Y REFRINGENTES
PROTEINAS (PA)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AC. NUCLEICOS (E)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GAG ACIDOS (AB)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GAG NEUTROS (PAS)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. LIPIDICO (SB)	-	-	-	af. - escasos	-	-	-	-	-	-
COLESTEROL (S)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 2: Características citológicas de los elementos celulares del testículo.

células cistales. El núcleo, central, ocupa gran parte de su volumen; presentan un nucléolo, cromatina en gránulos, carioplasma cromóforo y citoplasma poco cromófilo sin inclusiones. Se suelen observar figuras mitóticas.

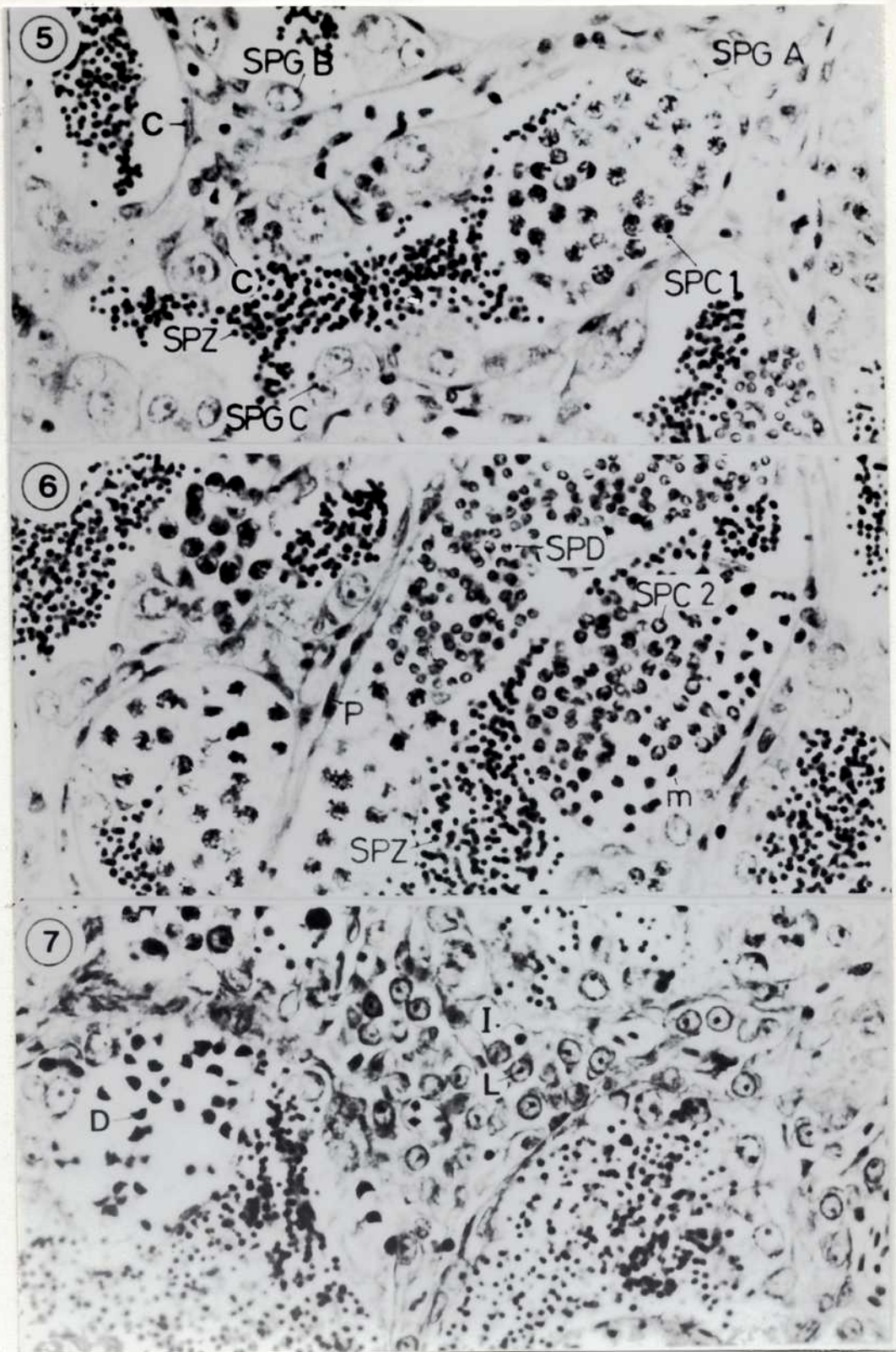
- Espermatogonias tipo B (SPG B) (Fig. 5): poseen características similares a los SPG A, pero con diámetro menor: 9,36 μm ; presentan uno o dos nucléolos de 1,6 μm .

- Espermatogonias tipo C (SPG C) (Fig. 5): se encuentran en cistos multicelulares. Los límites no se distinguen fácilmente. Núcleos con gránulos densos de cromatina y nucléolo, semejantes a los del tipo B.

- Espermatocitos 1 (SPC 1) (Fig. 5): forman grandes cistos con numerosas células. Los núcleos son ovales o esféricos con la cromatina formando hilos grumosos y es relativamente fácil distinguir los distintos estadios de la profase de la primera división meiótica.

- Espermatocitos 2 (SPC 2) (Fig. 6): se encuentran formando grandes acúmulos celulares que se destacan por poseer núcleos de menor volumen que los SPC 1 y cromatina en cordones grumosos gruesos en varios estadios de condensación. El carioplasma es basófilo.

- Espermátidas (SPD) (fig. 6): El citoplasma se distingue con dificultad, por su cromofobia, observándose sólo los núcleos. Estos son esféricos, densos, intensamente basófilos, evidenciando una herradura de material nuclear más condensada de posición periférica. Su volumen se reduce condensándose el contenido durante la esper-



Figs. 5 y 6: Detalles de un testículo en período reproductivo. 800X, HE. Fig. 7: Detalle de un testículo en período de reparación. 800X, HE. Ref: Atresias celulares (D); Intersticio interlobular (I); Células de Leydig (L); Figuras meióticas (m); Célula peritubular (p); Espermatogonias: tipo A (SPG A), tipo B (SPG B), tipo C (SPG C); Espermatocitos: tipo 1 (SPC 1), tipo 2 (SPC 2); Espermátidas (SPD); Espermatozoides (SPZ); Célula cistal o de Sertoli (C).

miogénesis, en la que se observan distintos estadios. Antes de la ruptura del cisto y la liberación de los espermatozoides, éstos ya tienen su tamaño final.

- Espermatozoides (SPZ) (Fig. 5): se encuentran libres en la luz de los lóbulos y conductos eferentes. Están constituidos por un núcleo intensamente basófilo (cabeza) en el que se nota una zona más densa periférica y, respectivamente, por el flagelo (cola).

- Atresias celulares (D) (Fig. 7): es normal observar estadios de destrucción celular durante el ciclo de la gametogénesis. En efecto, se aprecian núcleos picnóticos, con forma de medialuna, principalmente entre los SPC. El citoplasma presenta zonas basófilas y los contornos celulares no están definidos. Es frecuente observar, además, en un mismo cisto, elementos de apariencia normal y elementos en regresión.

- Células cistales o de Sertoli (C) (Fig. 5): células epiteliales, de forma adaptada a su función, llenan todos los intersticios del epitelio germinal y envuelven a las células germinales. Sus núcleos, comprimidos por los cistos presentan formas triangulares o planas y en zonas libres se suelen presentar ovalados o planos. La cromatina es granulada fina y homogénea; en ocasiones se observa un nucléolo. En general basófilas, se detectan gránulos de fosfolípidos y de GAG's ácidos. Se encuentran rodeadas, hacia el exterior del cisto, por material PAS + que se interpreta como una membrana basal.

- Células intersticiales o de Leydig (L)

(Fig. 7): se ubican en pequeñas poblaciones celulares interlobulares. De núcleo elíptico o esférico, presentan la carioteca bien marcada, carioplasma basófilo finamente granuloso y es característico un nucléolo. El citoplasma presenta zonas granuladas, ácidos nucleicos, sudanofilia débil, gránulos proteicos y GAG's ácidos, pero es difícil definir los límites celulares.

- Células perilobulares (P) (Fig. 6): rodean a los lóbulos espermáticos. Fusiformes, de citoplasma escasamente distinguible, se marcan por poseer depósitos proteicos importantes, GAG's ácidos y fosfolípidos. Podrían ser células mioides, musculares lisas o fibroblastos próximos a una membrana basal muy densa.

- Células especiales de la túnica albugínea (E) (Fig. 8): distribuidas en la túnica albugínea, se encuentran en mayor número cerca de los grandes vasos sanguíneos. De forma muy variada, presentan citoplasma muy cargado de gránulos fosfolipídicos, siendo positiva la reacción para detectar tanto colesterol como sus ésteres y gránulos proteicos. Se presentan cromóforos a la tinción con H-E, evidenciando solo gránulos refringentes.

En las gónadas de algunos ejemplares estériles, capturados, hemos podido observar que las células de Sertoli, hipertrofiadas y de forma cúbica alta, presentan abundantes prolongaciones celulares y frecuentemente un nucléolo. La luz lobular, normalmente es pequeña; el tejido interlobular muy abundante y con numerosas células de Leydig. Sin embargo, la apariencia externa de esos testículos fue normal.

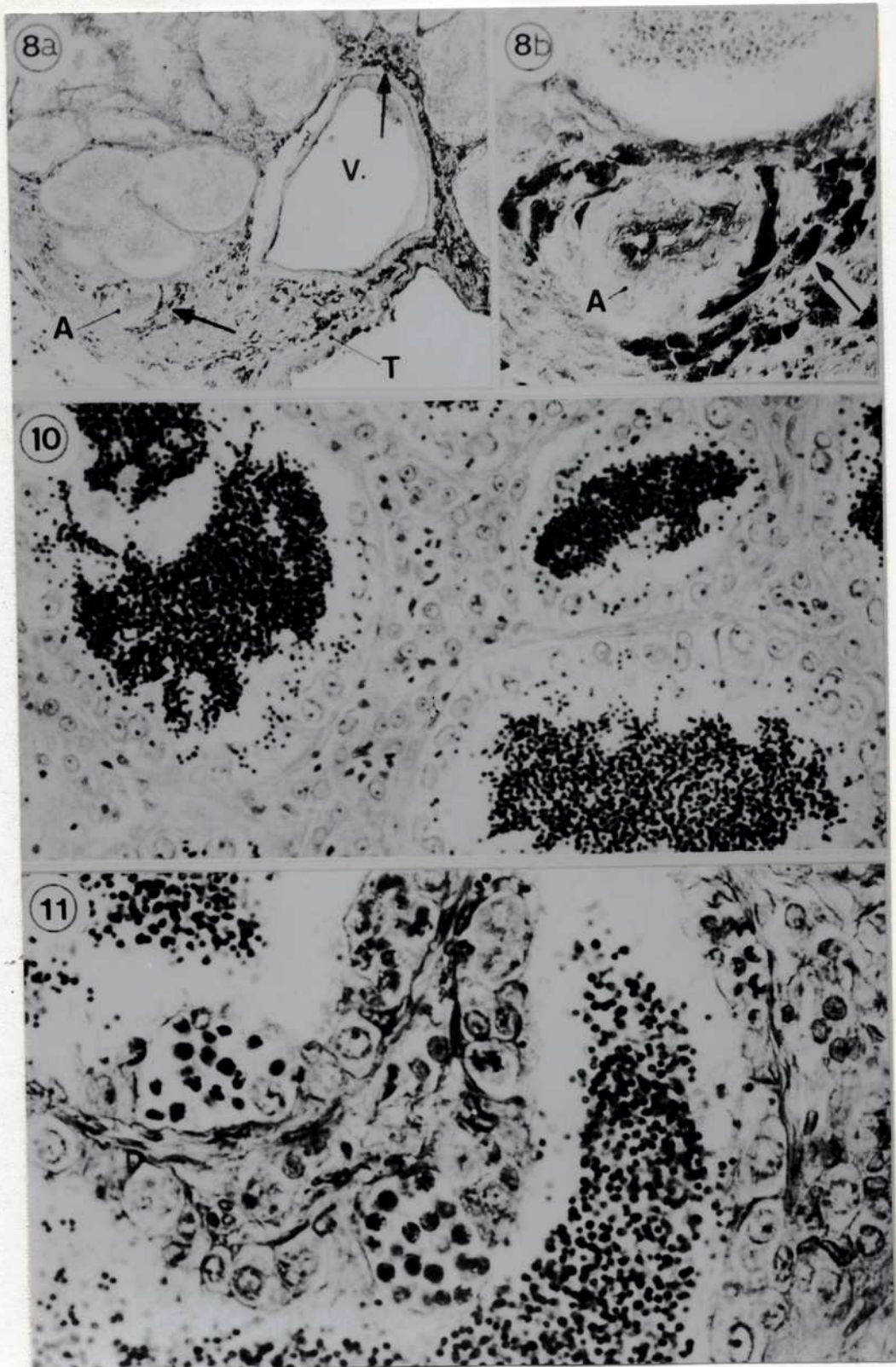


Fig. 8: a) Células especiales de la túnica albugínea (/). 200X, SB. b) Detalle 600 X, SB. Fig. 10: Testículo del período de proliferación, lóbulos tapizados por SPG, presencia de SPZ. 600X, HE. Fig. 11: Testículo del período de preparación, lóbulos con SPG y SPC, abundantes figuras meióticas y mitóticas, presencia de SPZ. 800X, HE. Ref: Artería testicular (A); Vena testicular (V); Túnica albugínea (T); Células especiales (/).

b.4) Ciclo anual testicular:

El análisis del área ocupada por los elementos celulares de la espermatogénesis, permite detectar diferencias significativas ($P < 0,05$) relacionadas con el ciclo anual, presentando cada elemento celular un patrón particular.

Para este estudio el año ha sido subdividido en quince períodos (en el texto entre paréntesis) con el objeto de obtener una mejor comprensión del ciclo dado que los meses de febrero, agosto y octubre presentan diferencias claves en sus dos quincenas (Fig. 9).

- Las espermatogonias se encuentran durante todo el año pero presentan tres fases sucesivas que expresan un incremento numérico progresivo hasta octubre (12) (Fig. 9 A). La primera fase se extiende de enero a mayo (6), la segunda de mayo a setiembre (11) y la tercera de setiembre a diciembre (15).

Las SPG A (Fig. 9B) presentan un ciclo de proliferación de marzo a noviembre (14) manteniéndose luego en número reducido hasta marzo (4). Las SPG B se mantienen relativamente constantes entre abril (5) y noviembre (14) sufriendo luego un crecimiento hasta marzo (4) y un súbito descenso. Las SPG C poseen un carácter cíclico marcado, ausentes entre julio (8) y agosto (10), se incrementan de manera marcada alcanzando el máximo en octubre (13), decreciendo luego.

Comparando las figuras 9 a y b se observa que la primera fase correspondería a una proliferación de SPG B y C que se verifica entre enero (1) y marzo (4). La

segunda fase coincide con parte de la curva de proliferación de los SPG A que, extendiéndose entre marzo (4) - octubre (13), se hace notoria entre abril (5) y setiembre (11). La tercera fase corresponde a la formación de los SPG C (Fig. 9 B) durante la cual alcanza su máximo (octubre (13)).

- Los SPC (Fig. 9 C) presentan marcada estacionalidad; ausentes durante los meses julio (8) - setiembre (11), aparecen en la primera quincena de octubre (12) y consideramos que marcan el inicio de la meiosis. Los valores máximos se alcanzan en diciembre (15) para descender luego paulatinamente.

- Las SPD (Fig. 9 D) evidencian la misma característica que las SPC pero desfasadas en el tiempo, ya que luego del período de ausencia (junio (7) - octubre (12)) se hacen presentes en la segunda quincena de octubre (13). Luego de un rápido incremento se estabilizan de diciembre (15) a abril (5) descendiendo entonces bruscamente.

- Los SPZ (Fig. 9 E), presentes durante todo el año en el lumen lobular, evidencian un comportamiento cíclico. A fines de octubre (13) y luego de haber atravesado una etapa de disminución (10-13), se encuentra un valor mínimo a partir del cual paulatinamente se alcanza un máximo entre mayo (6) y la primera quincena de agosto (10).

No se han constatado diferencias entre los valores de densidad de SPZ en el lumen testicular, ya que salvo variaciones individuales no se expresan cambios notables o significativos (Fig. 9 F).

Los extendidos de material testicular efec-

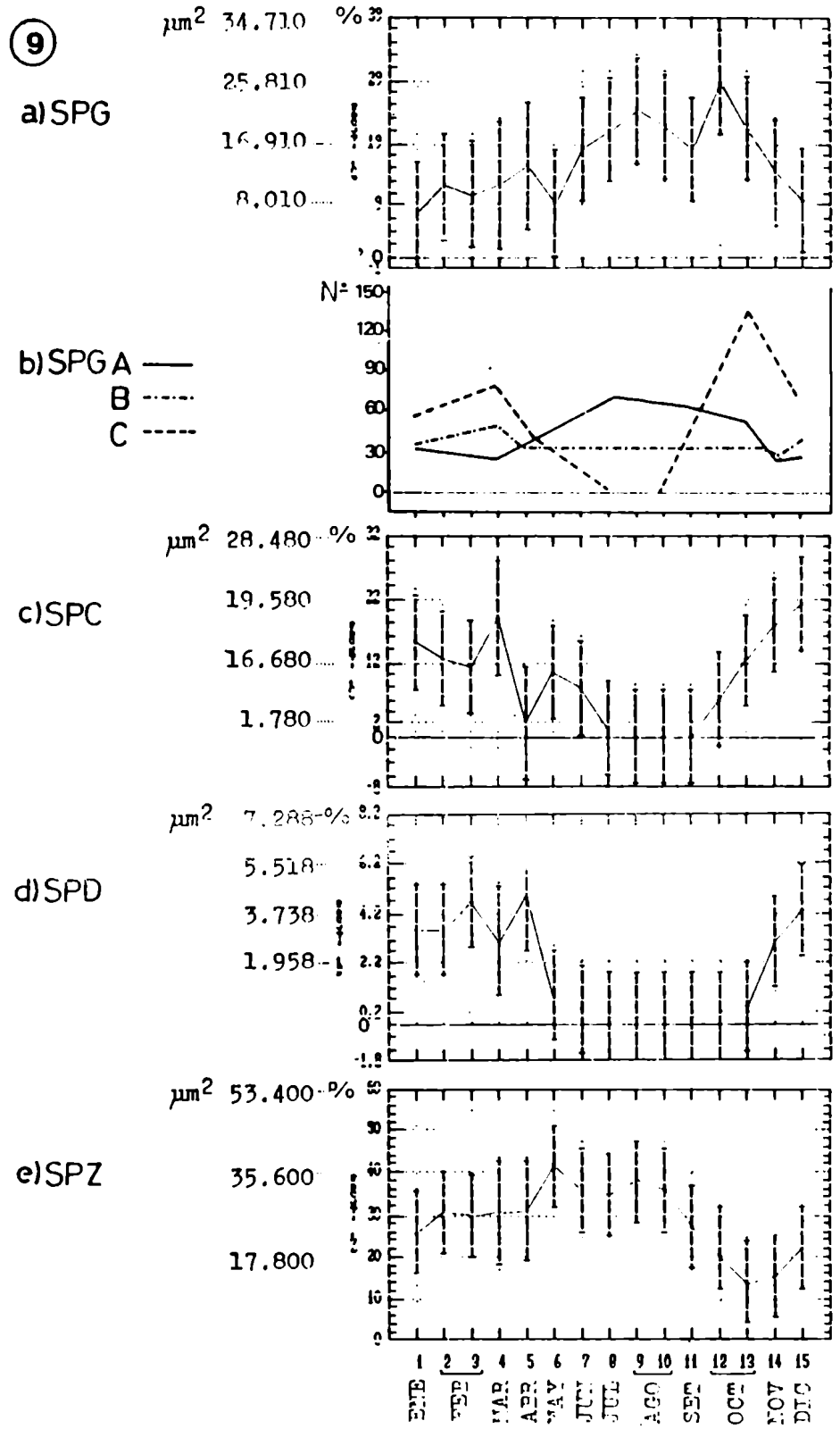
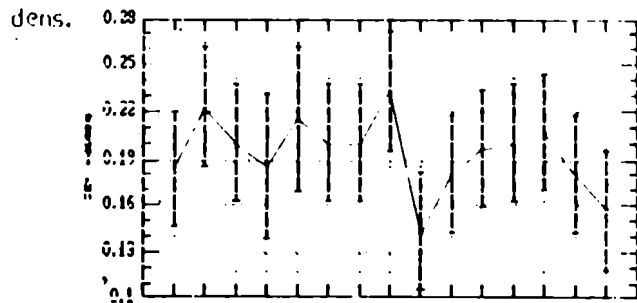


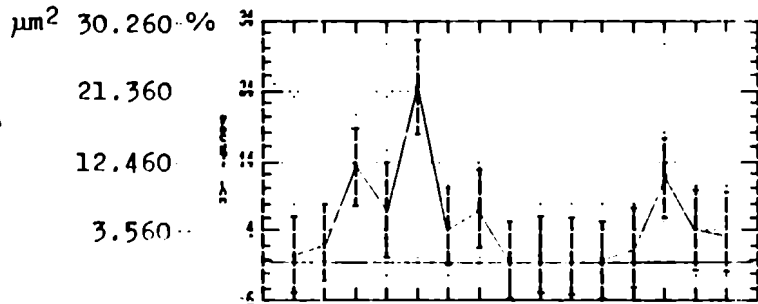
Fig. 9: Area ocupada por los distintos elementos de la espermatogénesis medida en μm^2 y en porcentajes respecto de un total de $89.000 \mu\text{m}^2$, número de SPG A, B y C, densidad de SPZ, número de células de Leydig y area de las mismas. Registros periódicos (1-15) mensuales o quincenales. Se encuentran graficadas las medias y los intervalos de confianza al 95%.

9

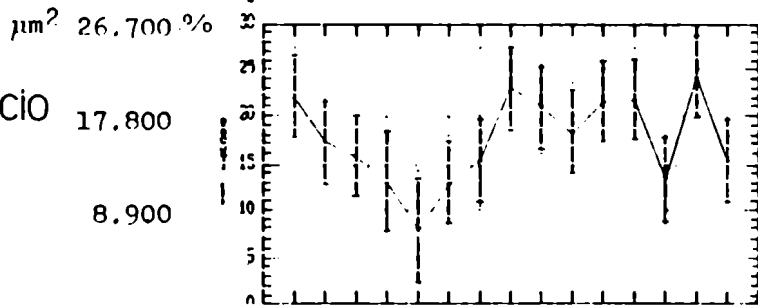
f) DENSIDAD SPZ



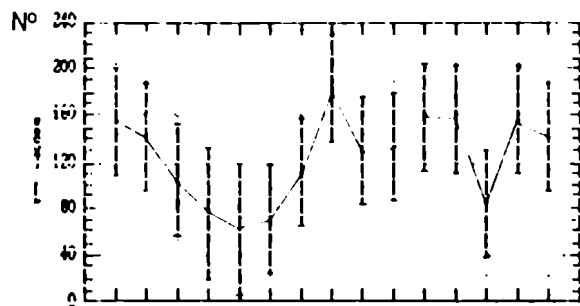
g) ATRESIA



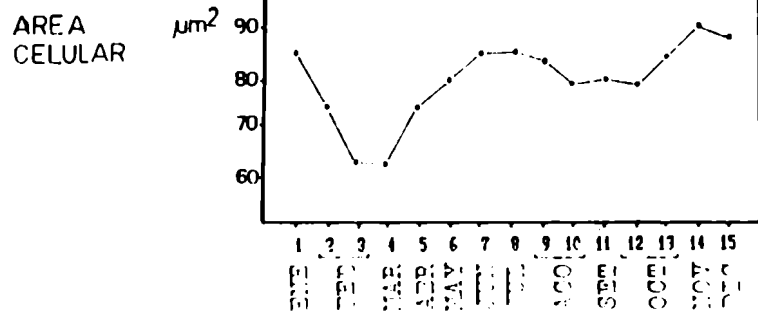
h) INTERSTICIO



i) LEYDIG



j) LEYDIG



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
P1 P1 P1 P1 P1 P1 P1 P1 P1 P1 P1 P1 P1 P1 P1

tuados en distintos meses, revelaron que los SPZ son siempre móviles.

- Las atresias celulares, observables en los SPC y SPD tempranas, presentan variaciones cíclicas (Fig. 9 G). Estas comienzan a observarse al iniciar la melosis (inicios de octubre (12)) y continúan hasta febrero (2) presentándose en escasa cantidad; en la segunda quincena de febrero (3) se incrementan y permanecen en elevada proporción durante marzo (4) y abril (5), decreciendo luego hasta volver a desaparecer en julio (8).

- El intersticio testicular también sufre variaciones cíclicas de volumen (Fig. 9 H). Se reconocieron dos ondas sucesivas, la primera de abril (5) a octubre (13) y la segunda desde este mes hasta abril (5) alcanzando su máximo en noviembre (14).

- Las células de Leydig mantienen el mismo patrón que el intersticio, reflejando la existencia de dos ondas sucesivas que expresan un incremento numérico (Fig. 9 I) que se encuentra precedido por una hipertrofia celular (Fig. 9 J). La primer onda presenta un aumento muy pronunciado, alcanzando el máximo en julio (8) y manteniéndose elevado hasta la primera quincena de octubre (12); luego de un descenso abrupto pero de poca magnitud se vuelve a incrementar iniciándose la segunda onda con un mínimo en abril (5) (Fig. 9 I).

El análisis histoquímico, efectuado a lo largo del ciclo año señala que existirían diferencias es-

tacionales en las células especiales de la túnica albugínea, encontrando fosfolípidos, colesterol y sus ésteres desde abril (5) hasta octubre (12) pero no durante la época reproductiva en noviembre (14).

En las células de Leydig la prueba de colesterol no ha dado resultado y la cantidad de lípidos resulta escasa durante todo el año (tabla 2).

El análisis permite reconocer que la onda mitótica de proliferación de SPG es considerable de abril a setiembre. En la primera quincena de octubre se inicia la meiosis produciéndose SPC; en la segunda quincena de octubre se encuentran formadas las primeras SPD y en noviembre se diferencian los SPZ. Cabe destacar el paralelismo que existe entre las curvas de los SPC, SPD y SPZ durante el período octubre-enero junto con el descenso proporcional de las SPG indicando la formación sucesiva de los otros elementos celulares.

La atresia cobra destacada importancia a fines de febrero y principalmente en abril, mes en el que se evidencia la disminución brusca de los SPC.

Las células de Leydig acompañan la onda de proliferación de las SPG A.

Los procesos descritos permiten subdividir el ciclo testicular de H.m.malabaricus en cuatro períodos funcionales:

- Período reproductivo: desde la diferenciación de los SPZ a fines de octubre-noviembre hasta antes de

iniciarse la atresia **masiva**, primera quincena de febrero (Fig. 4, 5 y 6).

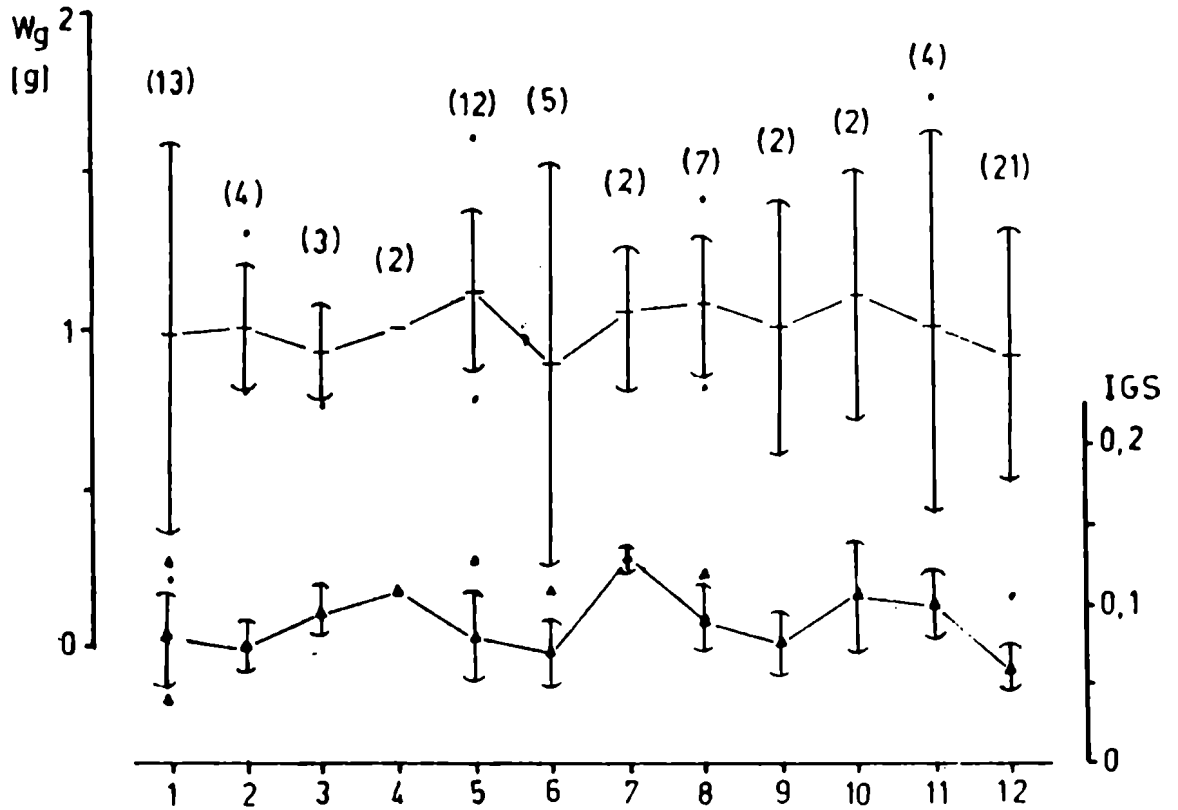
- Períodos postreproductivo o de reparación: con atresia y sucesiva remoción de los SPC y SPD, desde la 2a. quincena de febrero hasta abril-mayo (Fig. 7).

- Período de proliferación: división mitótica de los SPG, culmina la remoción de los SPC y SPD, proliferación de las células de Leydig: abril-mayo a setiembre (Fig. 10).

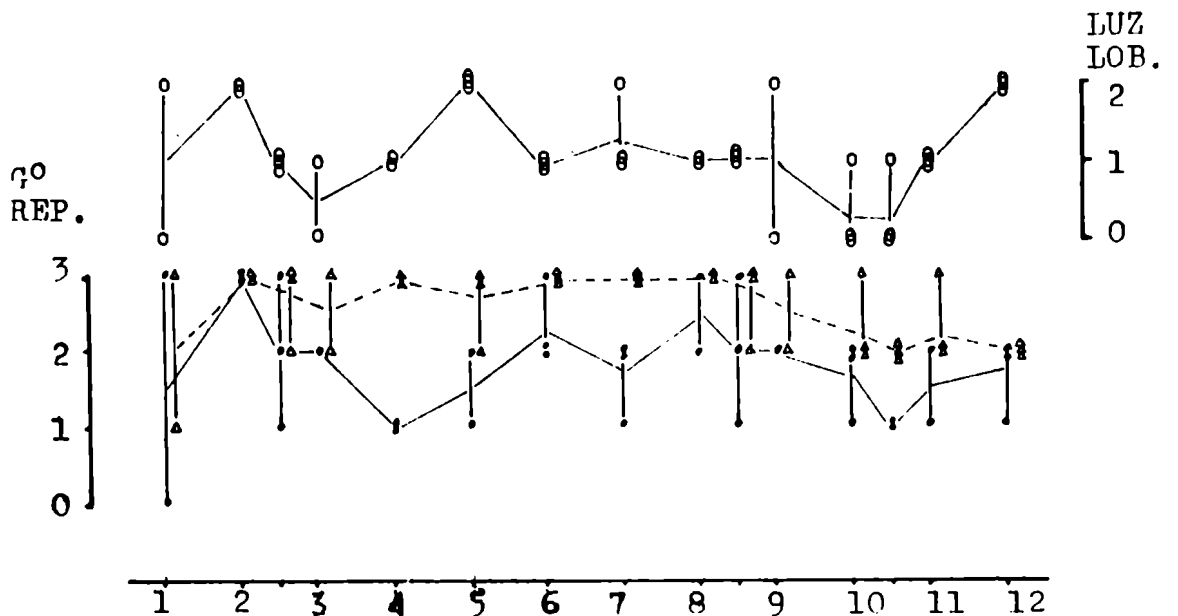
- Período de preparación: la meiosis se inicia en la primera quincena de octubre, hasta la diferenciación de los SPZ, finés de octubre-noviembre (Fig. 11).

El índice gonadosomático (IGS) permanece constante a lo largo del ciclo anual, no reflejando características estacionales ya que los testículos no sufren variaciones de volumen ni de peso (Fig. 12).

Los ductos eferentes siempre contienen SPZ. Los lóbulos espermáticos se encuentran permanentemente colmados de SPZ. La luz tubular sufre pequeñas variaciones en marzo (3) y octubre (10) permaneciendo en general ensanchados (Fig. 13).



12



13

Fig. 12: Peso testicular (WG) e Índice Gonado-Somático (IGS) registrado durante el año, entre paréntesis se indica el número de animales considerados. Fig. 13: Grado de regresión de los túbulos seminíferos (Δ - Δ) y de los conductos eferentes (\bullet \bullet) y luz de los lóbulos seminíferos registrados durante el año.

A.4 DISCUSION

a) Estructura de los testículos:

Los testículos de H.m.malabaricus ocupan toda la longitud de la cavidad general del cuerpo. Presentan la misma estructura en toda su extensión; los ductos deferentes se unen con el conducto urinario desembocando en la papila urogenital.

Las espermatogonias se encuentran dispersas por todo el perímetro lobular, junto a los cistos de los distintos elementos de la serie espermática que al parecer se desarrollan in situ, liberando los SPZ al lumen lobular. Estas características concuerdan con el tipo "lobular" de testículo, también denominado de "espermatogonias no restringidas" (Grier, 1980; Billard et al, 1982) que constituye el tipo testicular más difundido entre los teleósteos, distribuido entre los Ostarioficeos, los Perciformes y Salmoniformes (Belsare, 1966; Nayyar y Sundararaj, 1970; Nichols y Graham, 1972; Arriaga, 1981; Barbieri et al, 1981; Nagahama, 1983). En cambio el tipo testicular denominado "tubular" o de "espermatogonias restringidas" se encuentra en los Atheriniformes, estudiados, dentro de las especies de nuestra ictiofauna, en el pejerrey (García Romeo, 1964), Platypoecilus maculatus (Russo y Pisanó, 1973) y en Cnesterodon decemmaculatus (Molero y Pisanó, DNP); presentan una ubicación apical de las SPG y en las etapas sucesivas de la espermatogénesis los cistos van migrando hacia la zona de los conductos eferentes no existiendo una

estructura homóloga al lumen lobular. En las especies vivíparas, Platypoecilus y Cnesterodon, la espermiogénesis se desarrolla íntimamente relacionada con las células de Sertoli; los SPZ de cabeza elongada son depositados en el tracto femenino dentro de espermatóforos.

Los conductos eferentes de H.m.malabaricus son dorsales presentando la particularidad de poseer células germinales en su cara ventral, pero nunca en su cara dorsal que está en contacto con la túnica albugínea. Entre los teleósteos existen diferencias en la ubicación de los conductos eferentes, los que pueden ser medulares como en Plecostomus (Arriaga, 1981) o dorsales como en Geophaqus (Barbieri et al, 1981) con las paredes tapizadas por células germinales en el primer caso o por células epiteliales en el segundo. La presencia de células germinales en una cara sola de los eferentes de H.m.malabaricus parece ser una peculiaridad de la especie que quizás merezca la atención en el estudio de la diferenciación sexual y la ontogenia de las gónadas.

b) Ciclo de la espermatogénesis:

Los tres tipos de espermatogonias en H.m.malabaricus evidencian cada uno un comportamiento particular. Las SPG C poseen el ciclo más marcado, correlacionado ($r = 0,84$) con el ciclo de los SPC desde noviembre (14) a junio (7). En efecto, en ese período las SPG C parecen diferenciarse produciendo SPC hasta agotarse, desapareciendo en julio (8) - agosto (10). En el mes de octubre

(12-13), que corresponde al inicio de la nueva fase mei6tica, las curvas de SPG C y SPC se encuentran desfasadas sugiriendo que la formaci6n de SPC a partir de los SPG C es lenta.

Las SPG B permanecen relativamente constantes en tanto que las SPG A fluctúan en forma contraria a las SPG C durante todo el ańo ($r = -0,81$) salvo durante octubre (12-13) ($r = 0,55$).

La renovaci6n de las SPG se origina a expensas de las c6lulas basales (troncales) o "stem cells". En H.m.malabaricus a ún no se ha precisado si 6stas corresponden a las SPG A o a las B debido al comportamiento que ambas presentan. En funci6n de las variaciones anuales y su relaci6n con otros tipos celulares parecería que pueden desarrollarse dos mecanismos alternativos:

1) Considerando a las SPG A como c6lulas basales (Fig. 14 a):

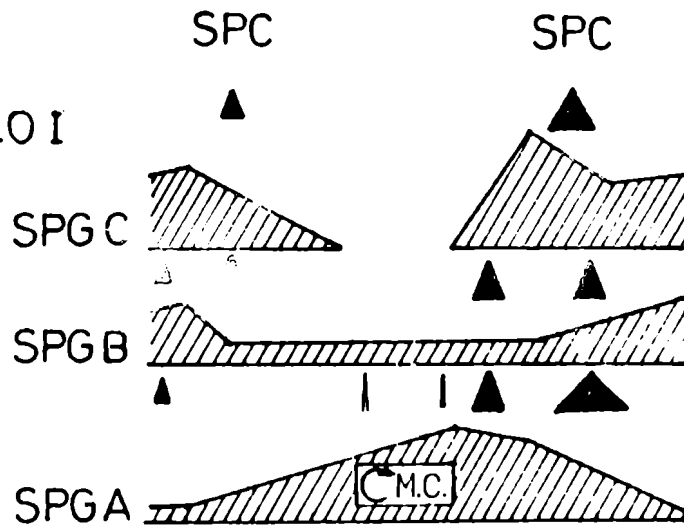
- Durante el per6odo de proliferaci6n (mayo (6)-setiembre (11)) las SPG A se dividen y crecen; s6lo pocas SPG A darían SPG B.

- En el per6odo preparatorio: (octubre (12-13)) Las SPG A se dividen formando SPG B y 6stas, multiplicándose r6pidamente conforman cistos de SPG C, de forma tal que las SPG B aparentan mantenerse constantes.

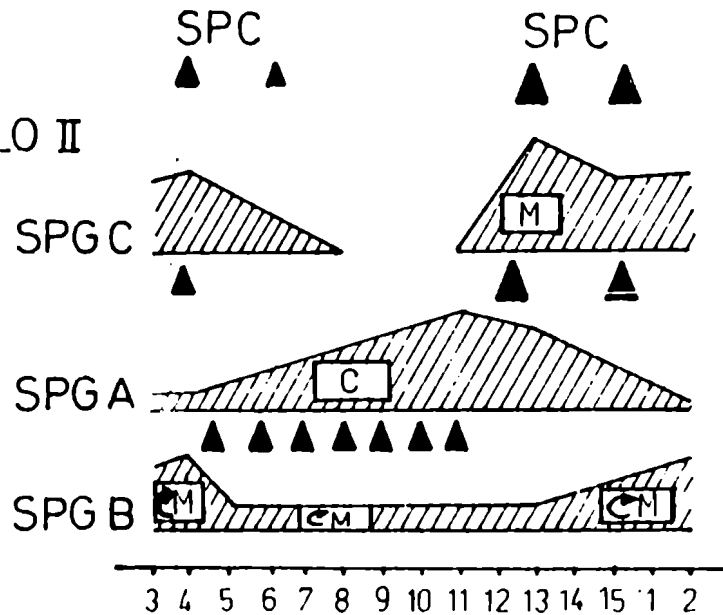
- Durante el per6odo reproductivo: (noviembre (14) - 1a. quincena de febrero (2)) Las SPG A disminuyen de n6mero debido a la incrementada producci6n de SPG B. Conjuntamente se forman SPG C en gran cantidad que mantie-

14

a) MODELO I



b) MODELO II



PERIODO: REPAR. PROLIFERAC. PREP. REPROD.

Fig. 14: Modelos de renovación de las SPG. a) Modelo 1, b) Modelo 2. Ref: Mitosis (M); Crecimiento (C); Autorenovación (C); Las flechas indican la intensidad de la renovación en cada periodo. Explicación en el texto.

nen el elevado número de SPC característico de este período.

- Durante el período de reparación (2a. quincena de febrero (3) - abril (5)). Las SPG A se encuentran escasas a causa de la formación de SPG B; comenzando la etapa de proliferación mitótica, en marzo (4), se detiene la formación de SPG B y conjuntamente disminuye la formación de SPG C a la vez que éstas continúan diferenciándose en SPC hasta desaparecer.

2) Considerando a las SPG B como células basales: (Fig. 14 b):

- Durante el período de proliferación: (mayo (6) - setiembre (11)). Las SPG B se dividen, renovándose y produciendo SPG A que sufren una fase de crecimiento, motivo por el cual las SPG B se mantienen constantes.

- Durante la preparación: (octubre (12-13)). Las SPG A disminuyen, originando por sucesivas divisiones a las SPG C. Las SPG B se mantienen constantes.

- Durante la reproducción: (noviembre (14) - 1a. quincena de febrero (2)). Las SPG A disminuyen aceleradamente ya que por divisiones sucesivas originan las SPG C. Las SPG B se dividen y por lo tanto aumentan de número.

- En el período de reparación: (2a. quincena de febrero (3) - abril (5)). Las SPG B se dividen continuando en aumentar su número. Las SPG A decrecen originando las últimas SPG C; en marzo (4) comienzan a formarse nuevamente las SPG A a expensas de las SPG B. Las SPG C remanentes, originan las últimas SPG C.

La hipótesis de considerar a las SPG A co-

mo células basales, está avalada por el hecho de encontrar SPG con las mismas características morfológicas y merísticas en ejemplares indiferenciados sexualmente (45 días de edad) y en otros de un año, es decir durante la primera maduración sexual (tabla 3). Además, en varias especies se ha aceptado que la célula de mayor tamaño, es decir la SPG A, se encuentra asociada con las "stem cells" o células basales (Nagahama, 1983). La segunda hipótesis considera que las SPG B se deben dividir permanentemente para mantener el proceso de la espermatogénesis. Al respecto Billard (1983), en un estudio cuantitativo de este proceso, observó que las "stem cells" deben dividirse más de una vez durante la reproducción, para proveer el número de gonias capaces de dar origen a la cantidad estimada de SP2.

En H.m.malabaricus no se han observado células germinales en ubicaciones extralobulares, por lo tanto la proliferación dependería de la presencia de estas células en los lóbulos, proceso similar a lo que sucede en otras especies de teleósteos, ya sea de SPG restringidas o no restringidas (Grier, 1975, 1976, 1981; Rosen Runge, 1977; Nagahama, 1983). Un caso diferente se ha observado en truchas, en Culaea inconstans y en Covessius plumbeus en los que parte de la renovación se verifica por células germinales primordiales interlobulares (Ahsan, 1966; Ruby y Mc Millan, 1975; Van den Hurk et al, 1978).

La fase de proliferación mitótica ocupa un largo período del año en H.m.malabaricus (de mayo a octubre como mínimo) y es denominada fase lenta o de división lenta

		DIAMETROS (\bar{x} en μm)		
		\bar{x} CELULAS	\bar{x} NUCLEO	\bar{x} NUCLEOLO
POSTLARVA (INDIFERENCIADA)		10,08	8,08	2,24
JUVENIL (MACHO)		12,32	8,32	2,24
		15,92	10,48	2,72
ADULTO (MACHO)	SPG A	11,84	8,16	2,16
	SPG B	9,44	6,32	1,6

Tabla 3: Dimensiones de la SPG en Juveniles y Adultos de H. m. malabaricus.

en Covessius plumbeus (Ahsan, 1966) y que según este autor incluye la formación de los SPC 1. En H.m.malabaricus los SPC 1 no parecen formarse rápidamente después de la proliferación de los SPG C, por lo tanto se encontrarían dentro de la fase lenta.

La espermiogénesis se verifica dentro de las células de Sertoli pero no se ha observado, al microscopio óptico, que haya alguna asociación celular con estas células. Los SPZ formados son liberados con el tamaño definitivo al lumen lobular. El período desde el que se verifica la presencia de SPC 1 hasta la formación de SPZ en H.m.malabaricus, abarca un mes concordando con las observaciones efectuadas en Salmo trutta fario (Billard, 1983) que determinaron cuantitativamente que los SPG B se transforman en SPZ a lo largo de un mes. En Poecilidos el análisis por autoradiografía revela que la cronología de la espermatogénesis y la espermiogénesis lleva 21 días desde el inicio de la profase meiótica, hasta la diferenciación de los SPZ (De Felice y Rasch, 1969).

H.m.malabaricus, durante el período de reparación, pierde la totalidad de los SPG C, SPC y SPD residuales. Por medio de la atresia celular son eliminados cistos que contienen estos elementos celulares. Concluida esta "limpieza" durante el mes de julio solo quedan SPG A y B en la pared lobular. Ahsan (1966) emite la hipótesis que los procesos de reabsorción de las células germinales serían mecanismos de conservación del ADN o previsiones para evitar maduraciones prematuras. Independientemente de estas dos po-

sibilidades se podría concluir que representan mecanismos para asegurar la formación ex novo de las gametas en cada período.

La degeneración de los elementos residuales se verifica, en mayor o menor grado, también en otras especies; algunas de éstas no llegan a eliminar completamente todos los elementos como Plecostomus cordovae (Arriaga, 1981). Otros, como Fundulus heteroclitus y Geophaqus brasiliensis, presentan una actividad cíclica que no se interrumpe completamente; en efecto, se encuentran siempre todos los elementos germinales (Mathews, 1938; Barbieri et al, 1981). En Salmo gairdneri, Covessius plumbeus y Culaea inconstans, luego de la remoción, quedan solo SPG A (Ahsan, 1966; Ruby y Mc Millan, 1970; Billard, 1983).

La eliminación del material residual se verifica principalmente en relación con las células de Sertoli, que en la etapa post-reproductiva poseen vesículas fagocíticas en Plecostomus cordovae (Arriaga, 1981), Salmo gairdneri (Billard et al, 1972; Van den Hurk et al, 1978), Salmo trutta fario (Billard, 1983), Poecilia latipinna (Grier, 1975) entre otras especies, revelándose como una característica común dentro de los teleósteos (Nagahama, 1983). En la reparación colaboran macrófagos libres en el lumen lobular en Salmo gairdneri, Plecostomus cordovae, Culaea inconstans (Billard, y Takashima, 1983; Arriaga, 1981; Ruby y Mc Millan, 1975) respectivamente, que fagocitan los SPZ residuales, tarea en la que también actúa el epitelio de los ductos espermáticos de S. gairdneri (Billard y Takashima, 1983). La reparación se

complementa con una lisis in situ de los SPZ dentro de los lóbulos espermáticos en Salmo gairdneri (Billard y Takashima, 1983).

En H.m.malabaricus la reparación se verifica removiendo todo el tejido que se encuentra en diferenciación, pero no se observa ni fagocitosis, ni lisis de los SPZ como así tampoco se han observado macrófagos libres en el lumen lobular. En el período post-reproductivo (de reparación) y durante el de proliferación se ha constatado que el nivel de SPZ permanece elevado e incluso es mayor que durante el período reproductivo.

Una primera conclusión de estas observaciones es que H.m.malabaricus no posee un mecanismo de eliminación de los SPZ residuales; los almacena hasta un momento situado entre el final del período de proliferación y el inicio del período de preparación en el cual aparentemente son evacuados. Una segunda conclusión es que parte de los elementos inmaduros no se atresian y consiguen diferenciarse en SPZ originando los altos niveles mencionados, en forma similar a lo observado por Billard (1983) en S. trutta fario en la que mientras quedan SPG B, se siguen produciendo SPZ.

Los SPZ obtenidos en macerados testiculares de H.m.malabaricus a lo largo del año fueron siempre móviles, evidencia de que no habían sufrido un deterioro notorio durante su almacenamiento, aunque nada puede decirse sobre su capacidad fecundante.

La presencia de SPZ todo el año, además de

ser una particularidad de la especie en estudio, determina que los lóbulos espermáticos se encuentren permanentemente distendidos; lo que no permitiría que se produjeran variaciones en el volumen testicular relacionadas con el ciclo anual. Este hecho, visible macroscópicamente, se corrobora con la falta de variación del IGS ya señalada por Calvo et al (1966) y que podría considerarse como otra característica también ligada a la escasa producción de semen de esta especie (Azevedo y Gomes, 1942; Pinto Paiva, 1972). Las características descritas no son comunes entre los teleósteos, dado que generalmente presentan variaciones de peso y de volumen reflejadas en el IGS testicular (Mathews, 1938; Ahsan, 1966; García Romey y Cordero Funes, 1964; Nayyar y Sundararaj, 1970; Ruby y Mc Millan, 1970; Van den Hurk et al, 1978; Arriaga, 1981; Billard, 1983, entre otros).

El tejido interlobular de H.m.malabaricus sufre variaciones estacionales relacionadas con el número y la hipertrofia de las células de Leydig en función del ciclo reproductivo. Se forman dos ondas sucesivas, siempre precedidas por variaciones de volumen de las células de Leydig; la primera concuerda con el período de proliferación en el que se forman por mitosis SPG A, la segunda coincide en cambio con la etapa reproductiva. Estas evidencias, si bien escasas, y a pesar de no haberse detectado la presencia de colesterol y sus ésteres, indicarían que las células de Leydig serían las productoras de andrógenos como en la mayoría de los teleósteos. En varias especies se ha observado la presencia de células de Leydig con variaciones de tamaño y

número relacionadas con la reproducción, así como la presencia de características ultraestructurales relacionadas con la síntesis de esteroides (retículo endoplásmico liso y mitocondrias con crestas tubulares) y presencia de enzimas del ciclo esteroidogénico (Stanley et al, 1965; Yaron, 1966; Wiebe, 1969; Yamazaki y Donaldson, 1969; Takahashi e Iwasaki, 1973 a y b; Van den Hurk et al, 1978; Arriaga, 1981; Nichols y Graham, 1972; Hiroi y Yamamoto, 1968; Gresik et al, 1973 a y b).

Las células especiales de la túnica albugínea de H.m.malabaricus poseedoras de gránulos lipídicos y de colesterol, son un elemento hasta ahora no señalado en el testículo de teleósteos y su función no puede ser descifrada a la luz de nuestros actuales resultados. Como única referencia relativamente comparable puede señalarse que Van den Hurk et al (1978) han encontrado en S.gairdneri células no descritas, con actividad paralela a las células de Leydig pero con diferentes características celulares en el tejido conectivo que rodea al vas deferens.

En numerosos trabajos se cita como posibles productoras de andrógenos a los "lobe boundary cells" (Marshall y Lofts, 1956; Ahsan, 1966; O'Halloran e Idler, 1970; Joshi, 1980) aunque en varias especies se han considerado estas células como homólogas a las células de Sertoli (Nichols y Graham, 1972; Grier, 1975). En H.m.malabaricus los cambios de forma de las células de Sertoli obedecerían a cuestiones estéricas en tanto que las células perilobulares no parecen presentar cambios estacionales que pudieran sugerir un rol esteroidogénico.

B. OVOGENESIS

B.1 INTRODUCCION

El sistema reproductor femenino de teleósteos es muy variable en relación con las distintas modalidades reproductivas. El ovario es un órgano par que se une en el extremo más caudal antes de desembocar en la papila urogenital; a veces, las dos gónadas, por fusión entre sí forman un ovario impar como en el caso de los vivíparos. La cavidad ovárica, que hasta el desove actúa como reservorio de los ovocitos ovulados, se continúa con un corto oviducto (Nagahama, 1983).

La reproducción, en general, es cíclica y de acuerdo con el patrón de desarrollo ovárico (Marza, 1938; Wallace y Selman, 1981) se reconocen tres grupos: a) Ovarios sincrónicos en los teleósteos que desovan una sola vez en la vida. b) Ovarios sincrónicos por grupos: poseen por lo menos dos poblaciones distintas de células germinales en diferentes estadios del desarrollo; este tipo, el más común, se encuentra en los teleósteos que desovan una vez al año en una estación reproductiva breve. c) Ovarios asincrónicos que contienen ovocitos en todos los estadios del desarrollo, sin presentar poblaciones dominantes, según se verifica en los ejemplares que desovan en forma parcial a lo largo de la temporada reproductiva.

La ovogénesis fue descrita en varias especies de teleósteos dividiendo el proceso en estadios de a-

cuerdo a criterios de tamaño, cantidad y distribución de las inclusiones celulares, la morfología de los cromosomas, del núcleo y de los nucleolos (Yamamoto et al, 1965; Wallace y Selman, 1981; Nagahama, 1983). Por lo tanto el número y las características de los estadios varían entre las varias especies y según los numerosos autores (Bara, 1960; Ulrich, 1969; Gupta y Yamamoto, 1972; Shackley y King, 1977; Wallace y Selman, 1981; Nagahama, 1983; Selman y Wallace, 1986; etc.). En forma independiente del número de estadios que han sido señalados en distintas especies la ovogénesis presenta procesos comunes: una fase de proliferación mitótica de las oogonias, un crecimiento primario de los ovocitos, una etapa de formación de los alveolos corticales (o vitelogénesis endógena), una vitelogénesis exógena (Wallace, 1978; Bun Ng e Idler, 1983) y, en ciertos casos, una vitelogénesis lipídica (Yamamoto et al, 1965). Una etapa de maduración final o nuclear, en que se completa la primera división meiótica, seguida de una fase de hidratación y la subsiguiente ovulación (Nagahama, 1983; Goetz, 1983).

Los ovocitos en su desarrollo más temprano se encuentran rodeados por células foliculares que más tarde forman la capa de la granulosa; la capa de la teca se forma en cambio a partir del tejido estromal (Nagahama, 1983). Con respecto a la función de las células de la granulosa es de considerar el papel regulador que ejercen mediante la secreción endócrina de esteroides. Numerosa evidencia experimental se ha recopilado sobre la síntesis inducida por gonadotrofinas de mediadores que producen la madura

ción final, y de 17β estradiol que actúa sobre la síntesis y secreción de la vitelogenina en el hígado (Wallace y Selman, 1981). Se ha caracterizado, primero en salmónidos y luego en otras especies, a la $17\alpha 20\beta$ dihidroxi - 4 - pregnen - 3 - ona como el mediador que actúa sobre el ovocito (Suzuki et al, 1981; Nagahama y Adachi, 1983; Nagahama et al, 1985) en cuya síntesis intervienen células de la teca y de la granulosa al igual que lo observado en la síntesis de 17β estradiol (Nagahama, 1983; Fostier et al, 1983).

Las membranas que rodean al ovocito de teleósteos suelen ser varias y a menudo se confunden debido al uso de una terminología amplia (membrana ovocitaria, membrana vitelina, zona radiata, zona pelúcida, corion). Directamente en contacto con el ovocito se encuentra una membrana que por su apariencia estriada al microscopio óptico es generalmente denominada "zona radiata", ultraestructuralmente se ha observado que presenta poros por los cuales pasan microvellosidades del ovocito y procesos de las foliculares (Nagahama, 1983). Existen controversias sobre el origen de estas membranas. En Hippocampus erectus y en Syngnathus fuscus así como en algunas otras especies, se cree que están formadas por el ovocito (Wourms, 1976; Tesoriero, 1977; Dumont y Brummett, 1980), clasificándolas como membranas primarias (Anderson, 1967). Las células foliculares contribuirían a formar ciertas zonas de algunas membranas compuestas por más de una hoja como en Cynolebias sp. (Wourms y Sheldon, 1976) siendo clasificada esa zona como una membrana secundaria. En varias especies estructuras gelatinosas, adhesivas y filamen-

tos coriónicos son sintetizados o bien proceden de la secreción apócrina de las foliculares (Chacon, 1975; Wourms y Sheldon, 1976; Busson-Mabillot, 1977; Shelton, 1978; Dumont y Brummet, 1980; Ohta, 1984; Matkovic et al, 1985; Cussac y Maggese, 1986).

El micropilo es una abertura en la membrana vitelina del ovocito que permite el paso del espermatozoide durante el proceso de fertilización, ya que éste carece de acrosoma (Laale, 1980); determina el polo animal del huevo. Con algunas variaciones interespecíficas, la abertura micropilar se continúa con una estructura infundibular en el caso de la existencia de un grueso corion gelatinoso (Shelton, 1978; Cussac y Maggese, 1986) o bien un adelgazamiento en las envolturas secundarias delgadas (Dumont y Brummet, 1980; Kobayashi y Yamamoto, 1981).

Calvo et al (1966); Pinto Paiva (1972) y Caramaschi et al (1982) han efectuado las descripciones de la ovogénesis en H.m.malabaricus que han sido sintetizadas en la tabla 1 y comentadas en la introducción general. Las escalas de maduración ovárica allí vertidas se compararán con los presentes resultados.

El objetivo de este capítulo es analizar el ciclo de la ovogénesis en sus aspectos anatómicos y dinámicos.

B.2 MATERIAL Y METODOS

Muestras de ovarios y ovocitos sueltos fueron fijados en Bouin, Ancel-Vintemberger, Baker o formol 5% (Martoja y M. Pierson, 1970). Luego de ser medidos y caracterizados macroscópicamente fueron procesados para estudios histológicos incluyéndolos en parafina-cera de abejas

(Pf: 58-60°C). Las secciones de 5 µm fueron coloreadas con hematoxilina de Ehrlich-eosina (HE) y con el tricrómico de Masson (TM) (Martoja y M. Pierson, 1970). Los ovocitos con plaquetas vitelinas, difíciles de cortar normalmente, fueron seccionados a 10 µm pincelando el taco con colodión antes de efectuar cada corte; luego, para colorearlos se extrajo el colodión con alcohol absoluto-eter antes de proceder a desparafinarlo.

Se han empleado varias técnicas histoquímicas para detectar:

- glicosaminoglicanos (GAG) neutros: (PAS) ácido periódico de Schiff.
- glicosaminoglicanos ácidos: (AB) alcian blue pH 2,5.
- proteínas: (MB) mercurio azul de bromofenol.
- fosfolípidos: (SB) negro B sudan.
- DNA/RNA: (VP) verde de metilo-pironina.
- ácidos nucleicos: (G) gallocianina-técnica de Einardson (Troyer, 1980; Pearse, 1985).

Ovocitos procedentes de hembras inyectadas con suspensiones de hipófisis (9,5 hipófisis/kg), para inducir la maduración final y la ovulación, fueron fijados para su examen macroscópico e histológico acorde a la técnica expuesta. Muestras obtenidas por medio de canulación a través de la papila urogenital fueron estudiadas bajo lupa transparentando los ovocitos con solución clarificadora (ácido acético 6%; glicerina 4% y sol. fisiológica 90%). Ovocitos obtenidos de la misma forma fueron fijados en glutaraldehído

2,5% en buffer cacodilato 0,2 M (pH 7,3). Una vez deshidratados en un gradiente de acetona fueron enviados al servicio de Microscopía Electrónica de Barrido, Facultad de Odontología (UBA), para su metalizado y posterior observación.

Se calculó el índice gonadosomático (IGS) como:

$$\text{IGS} = \frac{\text{WG}}{\text{WT} - \text{WG}} \cdot 100$$

donde WG = peso del ovario, WT = peso total del ejemplar.

Ovarios cortados en secciones transversales gruesas (1 mm) fueron examinados bajo lupa (25 X) recontando el número de ovocitos en distintos estadios presentes así como los diámetros promedio de los mismos. Se ha calculado, como estimador del área ocupada por los distintos estadios ovocitarios, la fracción del área total que corresponde a cada estadio (fracción de área = FA) como $FA = A_k \cdot (\sum_{k=1}^K A_k)^{-1}$ para los K estadios presentes en cada muestra, donde $A_k =$ área calculada en base al radio (r) de los ovocitos y al número contado (N) $A_k = \pi \cdot r^2 \cdot N$ Utilizando para este cálculo los algoritmos expresados en un programa de computación.

B.3 RESULTADOS

Los ovarios de H.m.malabaricus, estructuras pares ubicadas en la pared interna dorsal del ejemplar, ocupan por toda su longitud la cavidad general del cuerpo fusionándose en su porción caudal en una zona muy cercana a la papila urogenital. Poseen sección que oscila de trian-

gular a redondeada, según la época del ciclo anuo y sufren además variaciones, en su espesor, relacionadas con el estado de maduración.

Los folículos ováricos se encuentran recubiertos por un epitelio que forma lamelas; éstas se introducen en el lumen del ovario desde la zona ventral de la pared donde se encuentran los grandes vasos sanguíneos (Fig. 16).

En función de sus características hemos considerado oportuno clasificar el desarrollo ovocitario de H.m. malabaricus en nueve estadios; por brevedad y comparación, sus peculiaridades macro y microscópicas han sido consignadas en las tablas 4 y 5, en tanto que la constitución histológica de los elementos celulares se encuentra en la tabla 6.

a) Estudio al microscopio estereoscópico: Tabla 4, Fig. 15

- Las ovogonias (OI) no son observables.

- Ovocitos basófilos (OII): aparecen translúcidos y su núcleo se observa por transparencia análogamente a lo que ocurre con los nucleolos. En los ovocitos de mayor volumen se visualiza el núcleo vitelino y algunas vesículas citoplasmáticas.

- Ovocitos en vitelogénesis incipiente (OIII): presentan numerosas vesículas vitelinas que ocupan gran parte del citoplasma dejando libre sólo una delgada franja periférica. Por el aumento numérico de estas vesículas, el ovocito se torna cada vez más opaco, hasta aparecer blanquecino a la luz reflejada.

	O II	O III	O IV	O V	O VI	O VII	O VIII
COLOREACION	TRANSLUCIDOS A OPALESCENTES	BLANQUECINOS	BLANCOS	BLANCO AMARI- LLENTOS	AMARILLENOS	AMARILLOS	AMARILLO OSCURO
MUCLEO	CENTRAL TRAN- LUCIDO	CENTRAL	CENTRAL	CENTRAL, DIFI- CIL DE OBSER- VAR	NO SE DISTIN- GUE, *1	*1	SIN
CITOPLASMA E INCLUSIONES	TRANSLUCIDO C/MUCLEO VITE- LINO Y VESICU- LAS GRANDES	VEVICULADO PERIFERIA SIN INCLUSIONES	ZONA CPACA ENTRE ZONAS MAS TRANSLUCI- DAS	CENTRO CPACO PERIFERIA ALGO TRANSLUCIDA	OPACO SUPERFICIE FI- NAMENTE GRANU- LADA	OPACO SUPERFICIE GRA NULADA GRUESA, POLCO ANIMAL DIS- TINGUIBLE	OPACO SUPERFICIE GRA NULADA GRUESA, POLCO ANIMAL DIS- TINGUIBLE

REP: *1: núcleo distinguible solo con solución clarificadora, posición variable entre lateralizada a periférica.

Tabla 4: Examen a bajo aumento de los ovocitos.

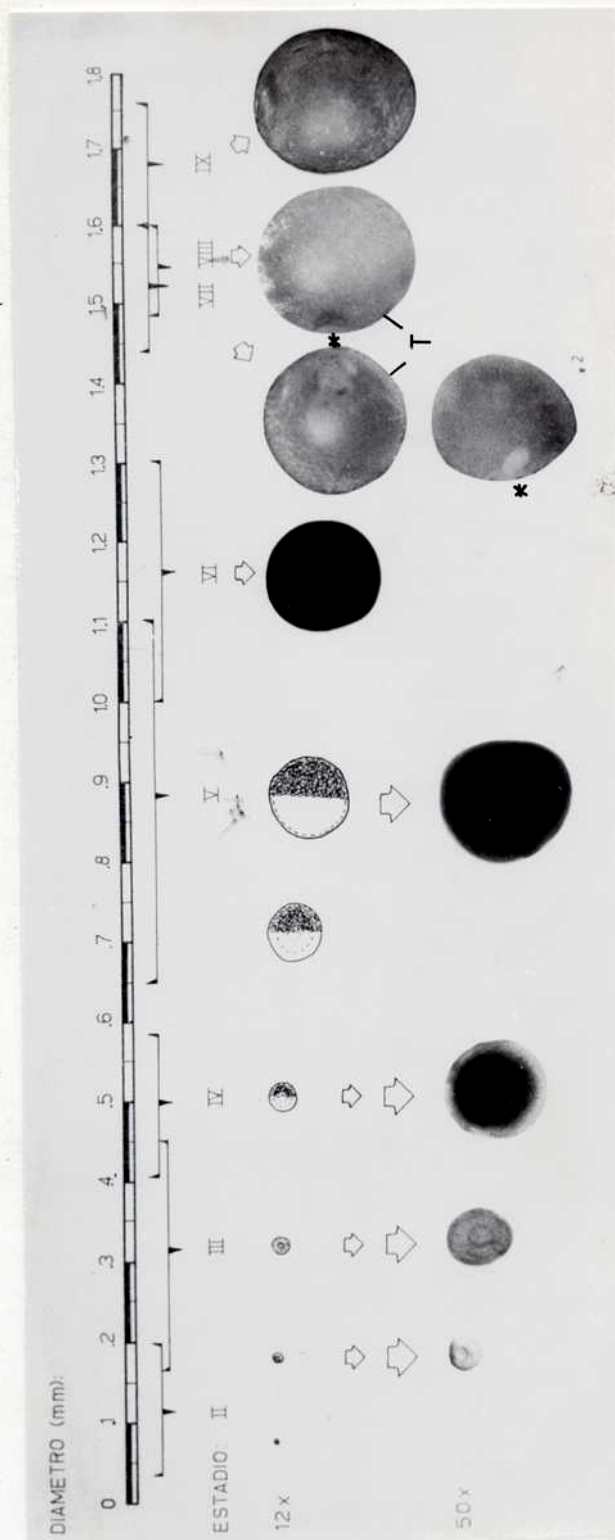


Fig. 15: Desarrollo de la ovogénesis. Observación a bajo aumento in toto, luz transmitida. Ref: Ovocitos transparentados (T); Corte a través de la vesícula germinal (2); Polo animal (*).

- Ovocitos en vitelogenénesis temprana (OIV): son blancos bajo luz reflejada pero, a la luz transmitida presentan una zona más opaca debida a gránulos de vitelo que se encuentran ubicados entre dos zonas más claras. Estas corresponden más internamente a la ubicación del núcleo y del citoplasma perinuclear y más externamente a la capa periférica que contiene las vesículas vitelinas.

- Ovocitos en vitelogenénesis tardía (OV): si bien se presentan opacos bajo luz transmitida, su zona periférica aparece más clara. El núcleo en fresco es difícilmente observable, sin embargo el uso de soluciones clarificadoras con- signa su posición central. Con luz reflejada el ovocito en este estadio se muestra blanco amarillento.

- Ovocitos vitelados (OVI): son totalmente opacos bajo luz transmitida y de color amarillo pálido con luz reflejada. El núcleo continúa en su posición central, por lo menos según lo demuestra el ovocito puesto en solución clarificadora.

- Ovocitos con vesícula germinal en migración (OVII): El polo animal es distinguible por un espesamiento citoplasmático blanco a la luz reflejada. Transparentando el ovocito se verifica la posición excéntrica del núcleo, que se encuentra lateralizado hacia el polo animal. Se presentan cargados de plaquetas vitelinas voluminosas que tornan la superficie ovocitaria granulada gruesa.

- Ovocitos maduros (OVIII): presentan características semejantes al estadio anterior pero no se observa el núcleo al efectuar el transparentado y las células foliculares pue-

den removerse con facilidad por acción mecánica.

- Ovocitos ovulados (OIX): se encuentran libres en la cavidad ovárica, despojados de las células foliculares y de ovocitos menos desarrollados que habitualmente se ubican en la periferia de los ovocitos VIII.

- Los ovocitos en estadios VI y VII que sufren atresia se distinguen por ser amarillos translúcidos con zonas blancas distribuidas en distintos sectores del ovocito.

b) Observaciones con microscopía óptica: Tabla 5, Figs. 16-29.

- Ovogonias (OI): aparecen aisladas o formando nidos que se ubican en el epitelio de la lámina ovárica. Presentan alguna variación en el estado de la cromatina que puede aparecer granulosa o resolverse en hebras cromosómicas o bien encontrarse en mitosis. Con mayor frecuencia se encuentra la cromatina con cromocentros adosados a la carioteca y un nucleolo central. Tabla 5, fig. 17.

Etapas de crecimiento primario:

- Ovocitos basófilos (OII): tabla 5, figs. 18-19. En los elementos menos voluminosos de este estadio, el núcleo presenta cromosomas plumulosos y basofilia citoplasmática, lo que indica el inicio del período de crecimiento ovocitario (fig. 18). La basofilia citoplasmática se debe a la presencia de gran cantidad de proteínas y de ácidos nucleicos. Durante la mayor parte de este período de maduración se encuentran, ubicadas al azar, en el citoplasma, algunas vesículas con contenido proteico, lipídico y con GAG ácidos, que desaparecen al finalizar la fase de ovocito basófilo.

	OOGONIAS	OOCITOS BASOFILOS	C. EN VITELÓGENO	INC. EN VITELÓGENO	INC. EN VITELÓGENO	INC. EN VITELÓGENO	INC. EN VITELÓGENO	INC. EN VITELÓGENO	INC. EN VITELÓGENO	INC. EN VITELÓGENO	INC. EN VITELÓGENO	INC. EN VITELÓGENO	INC. EN VITELÓGENO
	C I	O II	O III	O IV	O V	O VI	O VII	O VIII	O IX	O X	O XI	O XII	O XIII
AGREGACION	AI SLADOS O EN ACUMULOS	AI SLADOS	AI SLADOS	AI SLADOS	AI SLADOS	AI SLADOS	AI SLADOS	AI SLADOS	AI SLADOS	AI SLADOS	AI SLADOS	AI SLADOS	SU E LTOS
FORMA CELULAR	ESFERICA O ELIPSOIDAL	ESFERICA, ELIPSOIDAL O DRICA	ESFERICA, ELIPSOIDAL O DRICA	ESFERICA, ELIPSOIDAL O DRICA	ESFERICA, ELIPSOIDAL O DRICA	ESFERICA, ELIPSOIDAL O DRICA	ESFERICA, ELIPSOIDAL O DRICA	ESFERICA, ELIPSOIDAL O DRICA	ESFERICA, ELIPSOIDAL O DRICA	ESFERICA, ELIPSOIDAL O DRICA	ESFERICA, ELIPSOIDAL O DRICA	ESFERICA, ELIPSOIDAL O DRICA	ESFERICA, ELIPSOIDAL O DRICA
DIAMETRO CELULAR	10 a 10,4 µ	30 a 200 µ	176 a 424 por 270 a 600 µ	416 a 512 por 560 a 576 µ	0,165 a 0,75 por 1,05 a 1,1 mm	1,44 a 1,6 mm	1,44 a 1,6 mm	1,44 a 1,6 mm	1,44 a 1,6 mm	1,44 a 1,6 mm	1,44 a 1,6 mm	1,44 a 1,6 mm	1,6 a 1,76 mm
FORMA NUCLEAR	ESFERICA O ELIPSOIDAL	ESFERICA O ELIPSOIDAL	ESFERICA, ELIPSOIDAL O DRICA	ELIPSOIDAL CENTRAL	ELIPSOIDAL CENTRAL	ELIPSOIDAL CENTRAL	ELIPSOIDAL CENTRAL	ELIPSOIDAL CENTRAL	ELIPSOIDAL CENTRAL	ELIPSOIDAL CENTRAL	ELIPSOIDAL CENTRAL	ELIPSOIDAL CENTRAL	ELIPSOIDAL CENTRAL
POSICION	ELIPSOIDAL	ELIPSOIDAL	ELIPSOIDAL	ELIPSOIDAL	ELIPSOIDAL	ELIPSOIDAL	ELIPSOIDAL	ELIPSOIDAL	ELIPSOIDAL	ELIPSOIDAL	ELIPSOIDAL	ELIPSOIDAL	ELIPSOIDAL
CLAROTECA	LISA	LISA	CON REPLIEGUES	MUY REPLEGADA	MUY REPLEGADA	MUY REPLEGADA	MUY REPLEGADA	MUY REPLEGADA	MUY REPLEGADA	MUY REPLEGADA	MUY REPLEGADA	MUY REPLEGADA	MUY REPLEGADA
CARIOPLASMA	CROMOFORO	GRANULOSO	GRANULOSO	GRANULOSO	GRANULOSO	GRANULOSO	GRANULOSO	GRANULOSO	GRANULOSO	GRANULOSO	GRANULOSO	GRANULOSO	GRANULOSO
CROMATINA	GRANULOS PERIFERICOS	GRANULOS PERIFERICOS	GRANULOS PERIFERICOS	GRANULOS PERIFERICOS	GRANULOS PERIFERICOS	GRANULOS PERIFERICOS	GRANULOS PERIFERICOS	GRANULOS PERIFERICOS	GRANULOS PERIFERICOS	GRANULOS PERIFERICOS	GRANULOS PERIFERICOS	GRANULOS PERIFERICOS	GRANULOS PERIFERICOS
NUCLEOLOS	1 (Ø 2 a 3 µ)	16 a 96 µ	12 (Ø 10 µ)	12 (Ø 10 µ)	12 (Ø 10 µ)	12 (Ø 10 µ)	12 (Ø 10 µ)	12 (Ø 10 µ)	12 (Ø 10 µ)	12 (Ø 10 µ)	12 (Ø 10 µ)	12 (Ø 10 µ)	12 (Ø 10 µ)
DIAMETRO NUCLEAR	16 a 8 µ	18 a 96 µ	180 a 136 por 128 a 200 µ	60 a 128 por 180 por 176 µ	180 por 176 µ	180 por 176 µ	180 por 176 µ	180 por 176 µ	180 por 176 µ	180 por 176 µ	180 por 176 µ	180 por 176 µ	180 por 176 µ
AR													
CITOPLASMA	ESCARC, LEVEY. MUY BASOFILO	ALGC BASOFILO	ALGC BASOFILO	ALGC BASOFILO	ALGC BASOFILO	ALGC BASOFILO	ALGC BASOFILO	ALGC BASOFILO	ALGC BASOFILO	ALGC BASOFILO	ALGC BASOFILO	ALGC BASOFILO	ALGC BASOFILO
Z. PERINUCLEAR	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN
CITOPL. PERIF.	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN
NUCLEO VITELINO	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN
VESICULAS VIT.	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN
GRANULOS VIT.	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN
PLAQUETAS VIT.	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN
VESIC. CORTICALES	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN
MEMBRANA DEL OOCITO	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN
GRANULOSA	PLANAS, NO SE DISTINGUEN ENTRE SI	PLANAS, MAYOR NUMERO	PLANAS, MAYOR NUMERO	PLANAS, MAYOR NUMERO	PLANAS, MAYOR NUMERO	PLANAS, MAYOR NUMERO	PLANAS, MAYOR NUMERO	PLANAS, MAYOR NUMERO	PLANAS, MAYOR NUMERO	PLANAS, MAYOR NUMERO	PLANAS, MAYOR NUMERO	PLANAS, MAYOR NUMERO	PLANAS, MAYOR NUMERO
TECA	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN	SIN

Tabla 5: Características microscópicas de los elementos de la ovogénesis.

	COLORANTE					
	NS	MA	PAS	AB	VP	GA
CITOPLASMA	+	+	-	+++ ¹ . ²	+	+++ ¹ . ²
CITOP. PERINUCLEAR	-	+	-	+	-	-
VESICULAS VITELINAS	-	-	++	+++ ² . ³	-	-
GRANULOS VITELINOS	+++	+++	+	-	-	-
PLAQUETAS VITELINAS	+++	+++	+	-	-	-
NUCLEO VITELINO	-	++	-	-	-	-
MEMBRANA						
ZONA RADIATA	-	+++	+	-	-	-
ZONA EXTERNA	-	+++	+++	+++ ³ . ⁴	-	-
VESICULAS CORTICALES	-	-	+	+	-	-
CELULAS GRANULOSA	+	+	-	+	-	-
CELULAS TECALES	+	+	-	+	-	-

Tabla 6; Características histoquímicas de los ovocitos. Reacción a los distintos colorantes; - (sin reacción), +++ (reacción fuerte). Se detectaron cambios en la coloración en los estadios OII (1), OIII (2), OIV (3) y OV (4).

La técnica histoquímica para fosfolípidos (NS) revela leve positividad y se observa además gran cantidad de GAG ácidos citoplasmáticos. El núcleo vitelino, presente en las fases finales de este estadio, reacciona sólo a la tinción para proteínas (mercurio-azul de bromofenol). Tabla 6, fig. 19.

Etapas de formación de los alvéolos corticales o vitelogénesis endógena:

- Ovocitos en vitelogénesis incipiente (OIII): (tabla 5, fig. 20-22). En este estadio se reconocen tres etapas, que corresponden a manifestaciones sucesivas de la vitelogénesis endógena. Para obtener una definición más precisa hemos considerado oportuno señalarlas como: 1º) aparición de inclusiones PAS+ y AB+ en la periferia del ovocito (fig. 20), 2º) formación de vesículas de 6,4 á 10 μ m de diámetro, denominados **vesículas vitelinas (futuros alvéolos corticales)** en la misma ubicación que las inclusiones y que presentan las mismas características tintoriales que éstas (fig. 20-21), 3º) ocupación del citoplasma por vesículas vitelinas a causa de su paulatino aumento numérico, hasta colmar el ovocito (fig. 20-22). Alrededor del núcleo se diferencia una zona perinuclear con citoplasma homogéneo y más basófilo que el citoplasma remanente entre las vesículas.

Durante esta última etapa se acumulan gránulos que reaccionan positivamente a las técnicas para proteínas y fosfolípidos; inicialmente se ubican en la periferia del ovocito, pero paulatinamente se colocan entre las vesículas vitelinas de la región central. Estos gránulos representarían la primera manifestación de la vitelo-

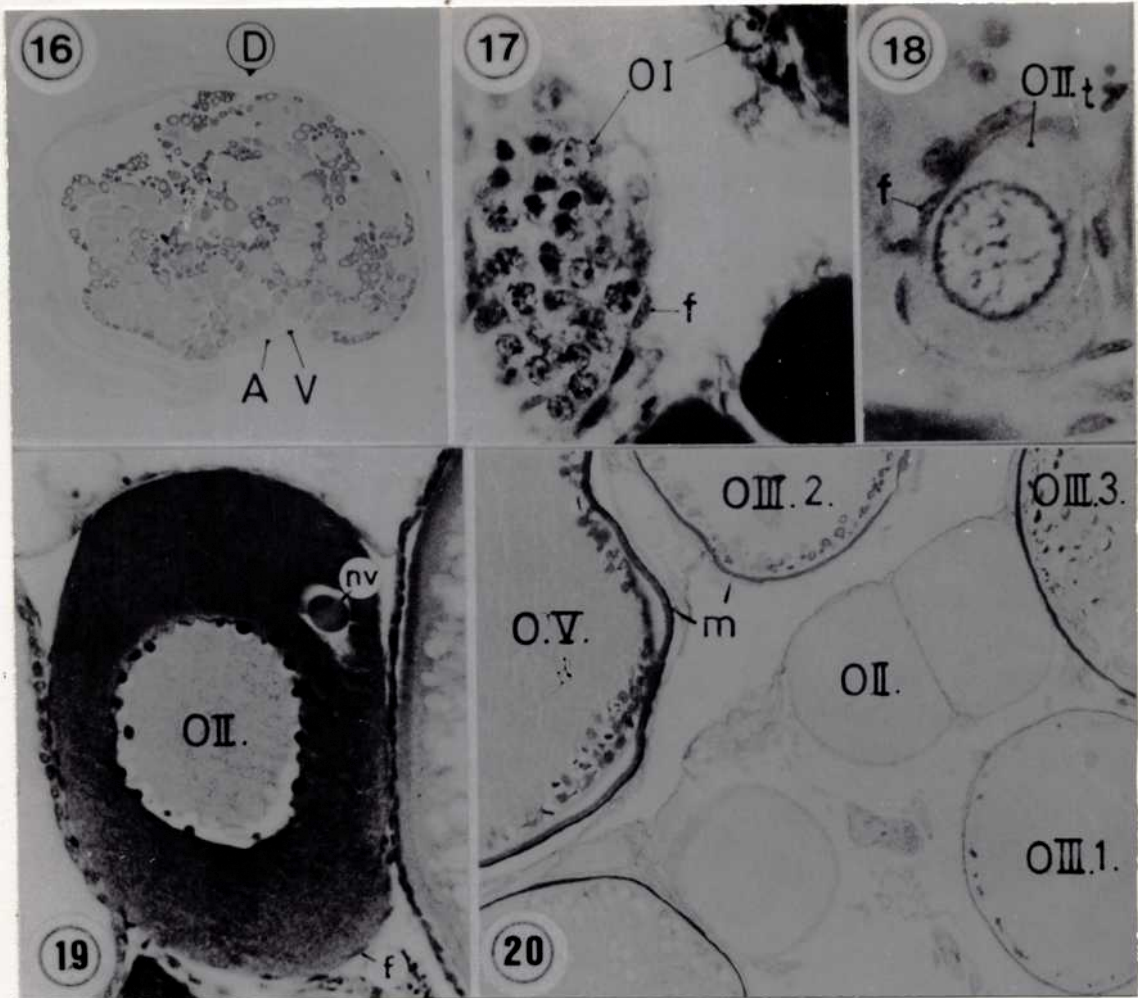


Fig. 16: Corte transversal de ovario inmaduro, las lamelas ováricas parten del área ventral. 9X, HE. Fig. 17: Ovogonias (O I) aisladas y en nido. 800X HE. Fig. 18: Ovocito basófilo temprano (O II_t), con cromosomas plumulados. 500X, HE. Fig. 19: Ovocito basófilo (O II). 400X, HE. Fig. 20: Ovocitos en vitelogenesis incipiente (O III) grado 1, 2, 3 y ovocito en vitelogenesis tardía (O V). 200X, PAS. Ref: Arteria ovárica (A); Células foliculares (f); Membrana del ovocito (m); Núcleo vitelino (nv); Vena ovárica (V); Dorsal D

génesis exógena (fig. 22). También en esta etapa comienza la formación de la zona radiata que se enriquece de material GAG y proteico que se distribuye alrededor del ovocito. Durante este período las células tecaes se discriminan de la granulosa y entre ambas puede reconocerse una membrana basal PAS+.

Con respecto al estadio OII se verifica una reducción de la basofilia del ovocito, debida en parte quizás, a la dispersión del citoplasma impuesta por la presencia de las vesículas vitelinas.

Etapas de vitelogénesis exógena:

- Ovocitos en vitelogénesis temprana (OIV): (tablas 5-6, fig. 23). Cuando las vesículas vitelinas llegan a la zona perinuclear son reemplazadas paulatinamente por gránulos vitelinos; éste proceso acontece en sentido centrífugo. Estos gránulos PAS+ y AB- poseen elevado contenido fosfolipídico y proteico. Externamente a la zona radiata se forma una capa densa muy PAS+ y AB+ que denominamos "zona externa" (fig. 23 b); ambas zonas constituyen la membrana del ovocito.

- Ovocitos en vitelogénesis tardía (OV): (tabla 5-6, fig. 20 y 24). Durante este estadio los gránulos vitelinos dan origen a las plaquetas vitelinas que conservan las mismas características histoquímicas. Debido al aumento de volumen del vitelo y por lo tanto del ovocito, las vesículas vitelinas adoptan una posición más periférica. Cabe señalar que tanto el citoplasma periférico como el perinuclear permanecen libres de vitelo. Se encuentra formado el micropilo

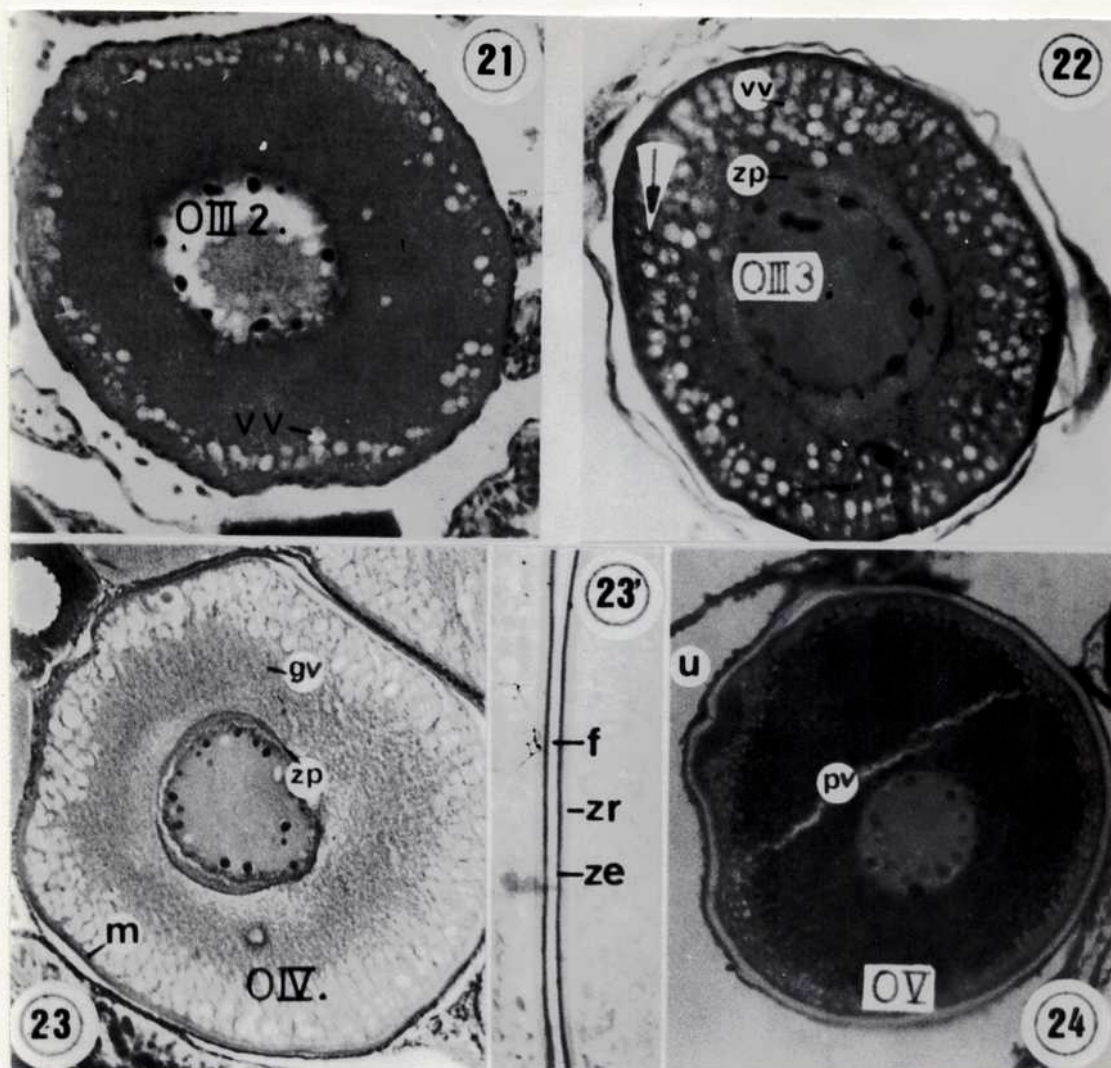


Fig. 21: Ovocito en vitelogénesis incipiente (O III) grado 2. 300X, HE.
 Fig. 22: Ovocito en vitelogénesis incipiente grado 3 (O III 3). 300X, MA.
 Fig. 23: Ovocito en vitelogénesis temprana (O IV). 200X, HE. Fig. 23': De-
 talle de O IV. 300X, PAS. Fig. 24: Ovocito en vitelogénesis tardía (O V).
 125X, NS. Ref: Células foliculares (f); Gránulos vitelinos (gv); Membrana
 del ovocito (m); Plaquetas vitelinas (pv); Vesículas vitelinas (vv); Zona
 externa (ze); Zona perinuclear (zp); Zona radiata (sr); Gránulos protéicos
 (/); Micropilo (u).

en la membrana del ovocito.

- Ovocito vitelado (OVI): (tabla 5, fig. 25). La incorporación de vitelo se refleja en el aumento del volumen ovocitario. El núcleo (o vesícula germinal) se encuentra en el centro del ovocito, mientras que la zona perinuclear se reduce considerablemente debido a la compresión por el vitelo. El citoplasma más periférico, rico en plaquetas vitelinas de pequeño volumen, contiene además una mono o bicapa de vesículas vitelinas (fig. 25). Las células de la granulosa y las de la teca son planas con citoplasma cromófilo y núcleos densos.

Etapa de maduración final:

- Ovocito con vesícula germinal en migración (OVII): (tabla 5, fig. 26). La vesícula germinal, durante este estadio, sufre una translación hasta ubicarse en la periferia del polo animal en el que se concentra la mayor cantidad de citoplasma. El componente citoplasmático remanente se encuentra distribuido entre las plaquetas vitelinas y forma además una delgada banda alrededor del ovocito. Adosados a la membrana celular se encuentran los alveolos corticales con contenido basófilo denso de GAG ácidos. En el vitelo la positividad a la reacción PAS decrece (tabla 6, fig. 26); se evidencia además un importante cambio en las células de la granulosa que presentan citoplasma claro, granulado y núcleo granuloso (fig. 28 b).

- Ovocito maduro (OVIII): (tabla 5, fig. 27-28). Se verifica la ruptura de la vesícula germinal, confundiéndose su contenido con el citoplasma del casquete animal. Esta zona

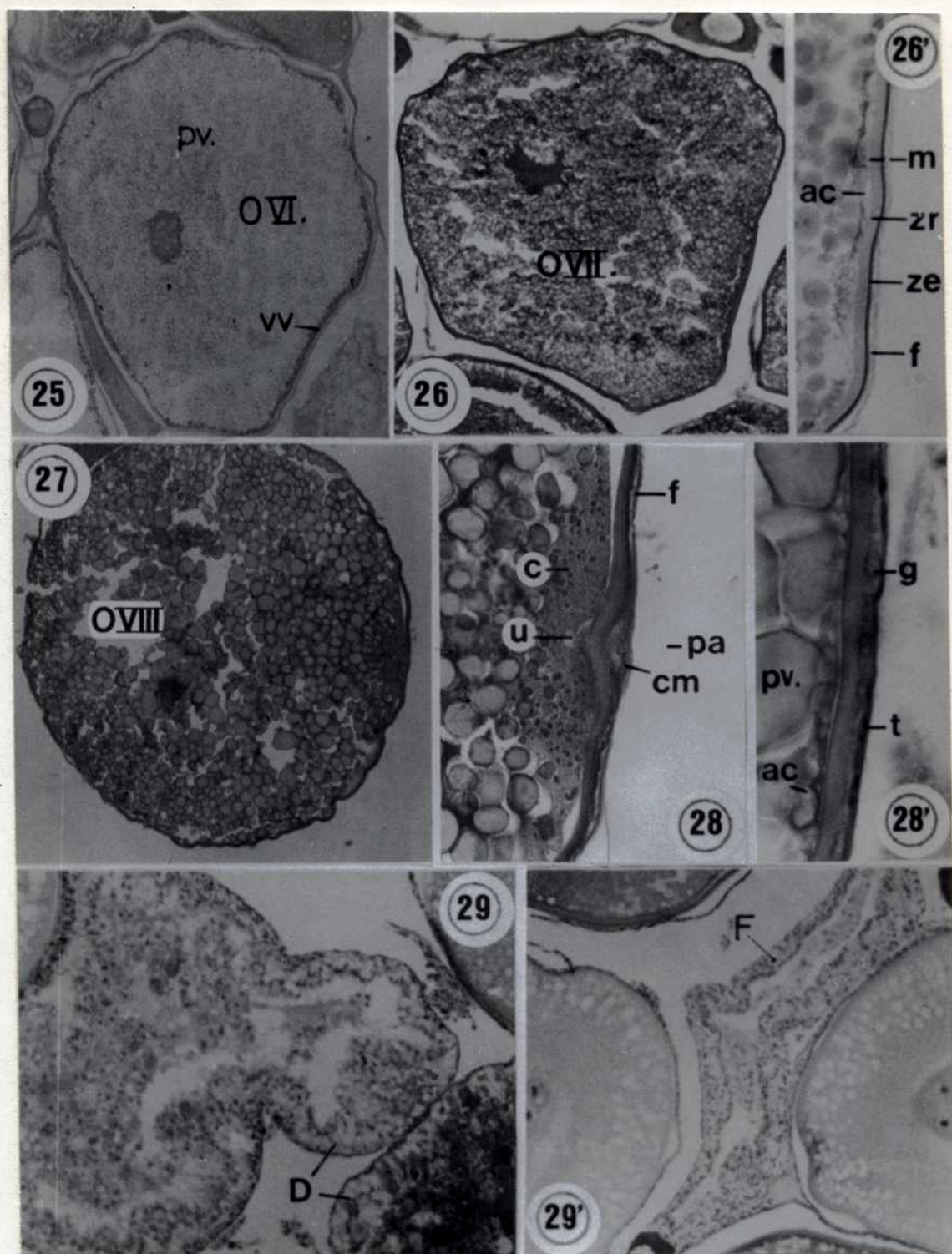


Fig. 25: Ovocito vitelado (O VI). 80X, AB. Fig. 26: Migración de la vesícula germinal (O VII). 50X, HE. Fig. 26': Detalle de la periferia del O VII. 500X PAS. Fig. 27: Ovocito maduro (OVIII). 80X, HE. Fig. 28: Detalle del O VIII polo animal. 360X, HE; Fig. 28': Detalle de la periferia del O VIII. 800X, HE; Fig. 29: Ovocitos en atresia (D). 200X, HE. Fig. 29': Folículo desovado (F). 200X, HE. Ref: Alvéolos corticales (ac); Citoplasma periférico engrosado (c); Célula micropilar (cm); Células foliculares (f); Células de la granulosa (g); membrana del ovocito (m); Plaquetas vitelinas (pv); Células de la teca (t); Polo animal (pa); micropilo (u); vesículas vitelinas (vv); Zona externa (ze); Zona radiata (zr).

de citoplasma en forma de casquete presenta mayor concentración de fosfolípidos y de proteínas, presumiblemente debido a la condensación citoplasmática. A nivel del micropilo se observa una célula micropilar voluminosa diferenciada de la capa de la granulosa folicular; su cuerpo celular forma una proyección que alcanza la superficie del ovocito. En la zona radiata, que se encuentra muy espesada en el área superior del casquete animal, se forma el infundíbulo en el que se aloja la célula micropilar (figs. 27 y 28.a).

Ovulación:

- Ovocito ovulado (OIX): libre de células foliculares, guarda las mismas características del estado anterior, pero su volumen es mayor.

En los ovarios examinados se ha encontrado un número considerable de ovocitos en atresia (fig. 29 b), con alteraciones marcadas como son la invasión del citoplasma por células probablemente foliculares y fusión de plaquetas vitelinas, lo que da origen a una masa amorfa. En los ovarios en los que recién se produjo la ovulación se encuentran además folículos vacíos formados por células cúbicas (fig. 29 a).

c) Observaciones con microscopio electrónico de barrido:

- Ovocito con la vesícula germinal en migración (OVII): Los ovocitos en una etapa temprana de la maduración final presentan un ordenamiento en forma de cono, primero en las plaquetas vitelinas situadas entre la vesícula germinal y la periferia micropilar (fig. 30) y, conforme avanza la migra-

ción de la vesícula germinal, en el citoplasma submicropilar (fig. 31). Entre las plaquetas vitelinas se observa la presencia de citoplasma y delgadas proyecciones que conectan a éste con los poros de la carioteca.

- Ovocito maduro (OVIII): Alcanzada la periferia, la vesícula germinal se desintegra y su contenido se confunde con la capa de citoplasma, más espesa, de la zona micropilar. Se observa menor cantidad de citoplasma entre las plaquetas vitelinas.

Rodean al ovocito dos capas de células foliculares, la interna o granulosa se presenta como un epitelio plano en el que sobresalen solo los núcleos (fig. 32). La segunda capa, la teca, también es un epitelio plano que forma una trama más engrosada sobre la primera (fig. 33).

Entre el ovocito y las células foliculares se extienden prolongaciones citoplasmáticas de ambos que atraviesan los canales de la membrana ovocitaria (figs 34 y 35). No se han detectado capas diferentes en esta membrana en los cortes transversales pero la superficie externa, plana con las perforaciones netas (fig. 36), es claramente distinta de la interna, donde los canales se continúan con suaves ondulaciones (fig. 35).

Previo a la ovulación las proyecciones citoplasmáticas del ovocito y de la granulosa parecen desprenderse como parte de la "maduración folicular" (fig. 36).

- Ovocito ovulado (OIX): El ovocito ovulado presenta sobre la membrana ovocitaria material finamente granulado que reviste los canales de la zona radiata (fig. 37), imagen totalmente diferente de la observada durante la etapa de madu-

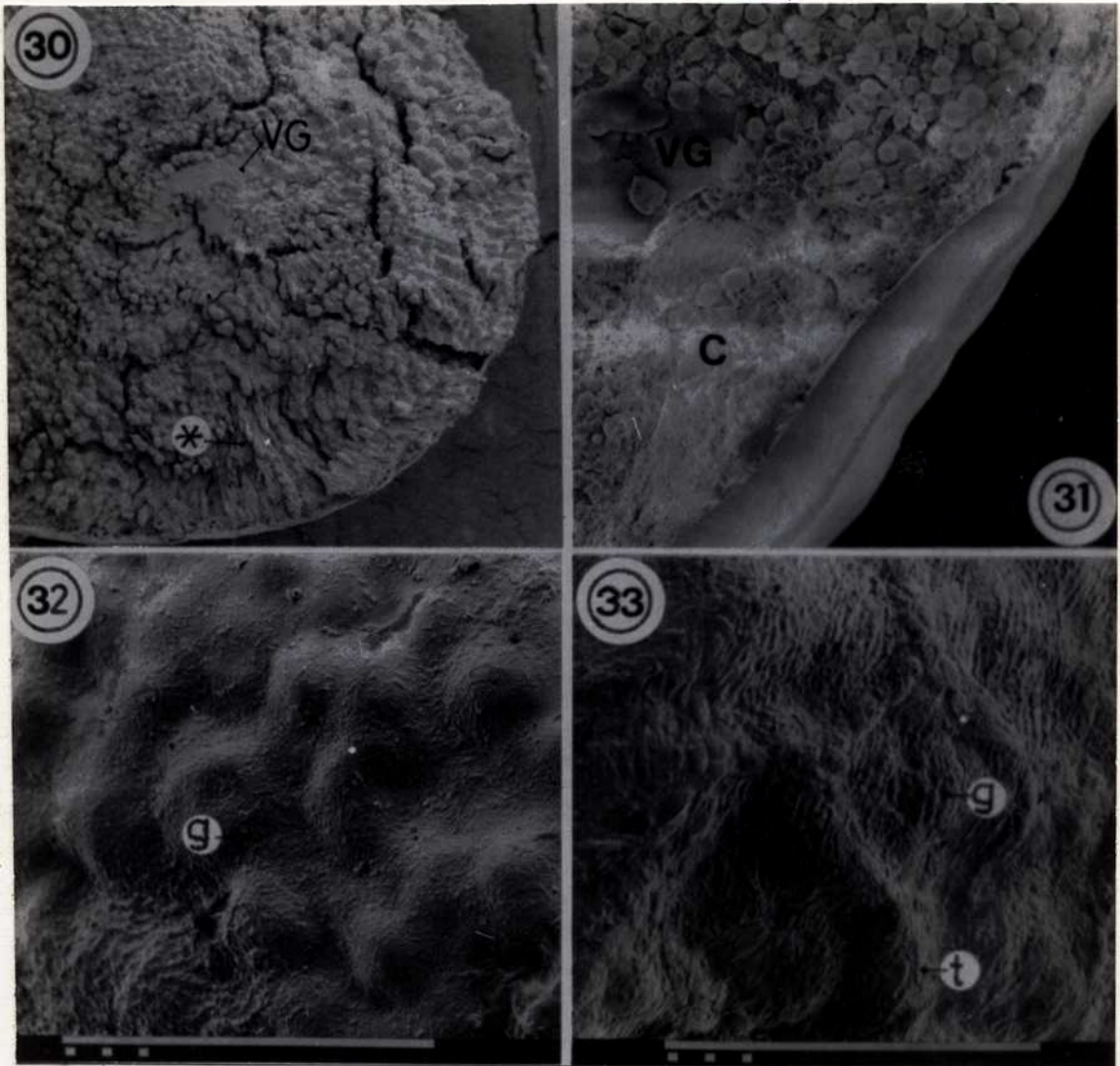


Fig. 30: Ovocito VII vesícula germinal (VG) lateralizada, nótese el ordenamiento de las plaquetas vitelinas desde la periferia hacia la vesícula germinal (*). MEB 70X. Fig. 31: Ovocito VII, vesícula germinal periférica, citoplasma acumulado bajo el polo animal (c). MEB 300X. Fig. 32: Ovocito VIII, células de la granulosa (g). MEB 700X. Fig. 33: Ovocito VIII, células de la teca (t) cubriendo las de la granulosa (g). MEB 700X. Escala 100 μ m.

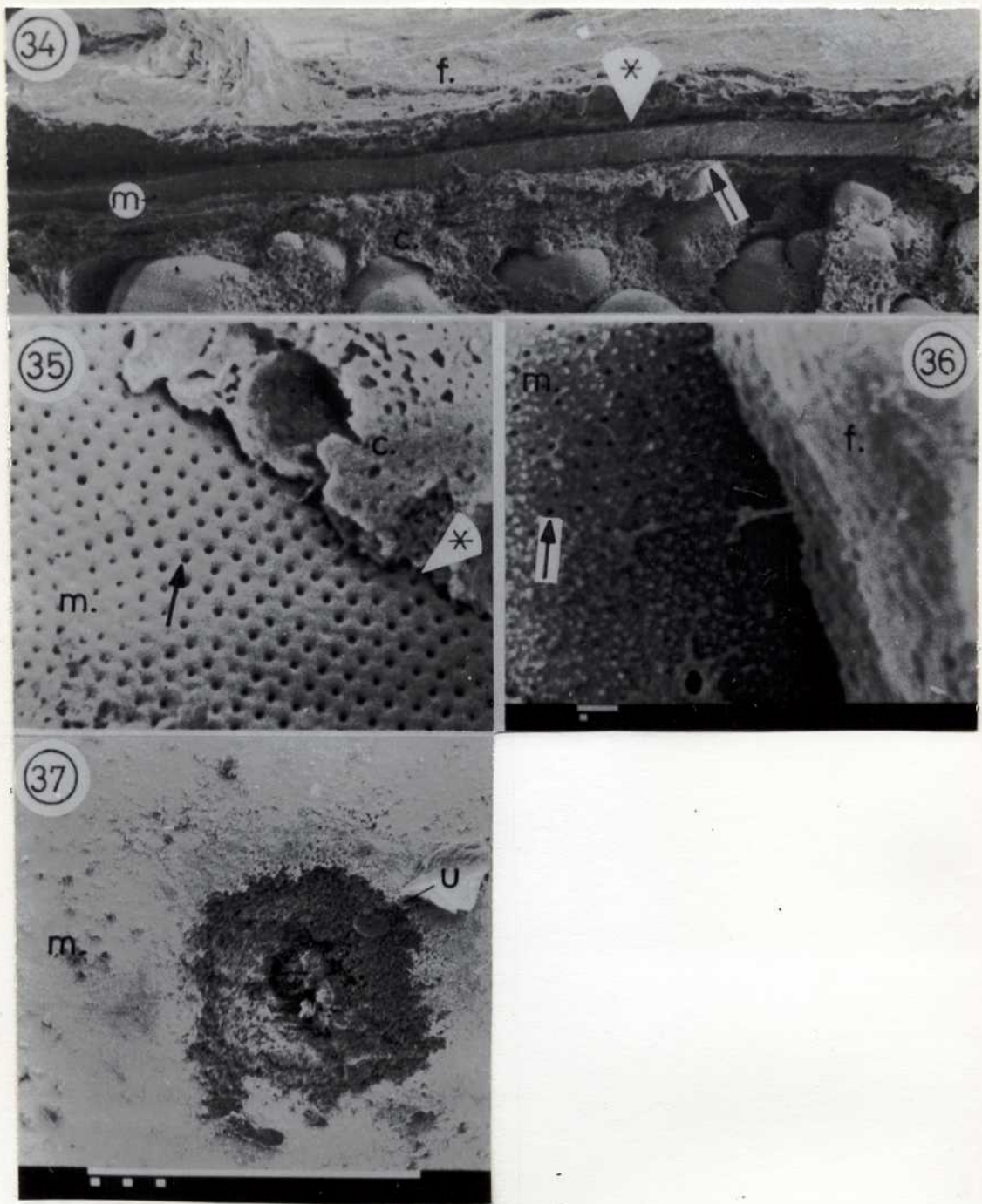


Fig. 34: Ovocito VIII, proyecciones de la granulosa (*). MEB 1000X. Fig. 35: Ovocito VIII, proyecciones del ovocito (*), membrana del ovocito vista interna. MEB 3000X. Fig. 36: Ovocito VIII membrana del ovocito vista externa. MEB 3000X. Fig. 37: Ovocito IX, vista del polo animal, micropilo (u), superficie de la membrana del ovocito luego de la ovulación. MEB 700X. Ref: Citoplasma cortical (c); Celulas foliculares (f); membrana del ovocito (m); poros canales (f).

ración folicular (fig. 36) la zona del micropilo, infundibuliforme, presenta la superficie muy irregular y distinta de la superficie de la membrana del ovocito (fig. 37).

d) Ciclo ovárico:

El análisis del área ocupada por cada estadio de la ovogénesis, relativo al total contado por ovario, o fracción de área (FA), permite aproximarse a la dinámica de la ovogénesis. Considerando las medias mensuales se ha observado que: los ovocitos basófilos (OII) (fig. 38), presentes durante todo el año, evidencian un ciclo con valores elevados entre abril-julio y un mínimo en noviembre. Los ovocitos que se encuentran formando las vesículas corticales (OIII) (fig. 38) presentan características semejantes a las anteriores, con valores relativamente elevados entre mayo-agosto y el mínimo en noviembre. Los ovocitos en vitelogénesis temprana (OIV) (fig. 39), estando presentes durante todo el año, manifiestan un carácter cíclico con valores elevados entre marzo-abril que luego descienden para, desde julio, estabilizarse por el resto del año.

Con el estadio de vitelogénesis tardía (OV) (fig. 39) se inicia una fase marcadamente estacional que también se registra en los estadios sucesivos; los OV luego de un período de ausencia (mayo-julio) se incrementan progresivamente presentando el valor máximo en febrero. Los ovocitos vitelados (OVI) (Fig. 40) se encuentran presentes solo de octubre a marzo con el máximo en enero. Los ovocitos en maduración final (OVII) (fig. 40) se encuentran entre los meses de octubre a febrero con el máximo en noviembre.

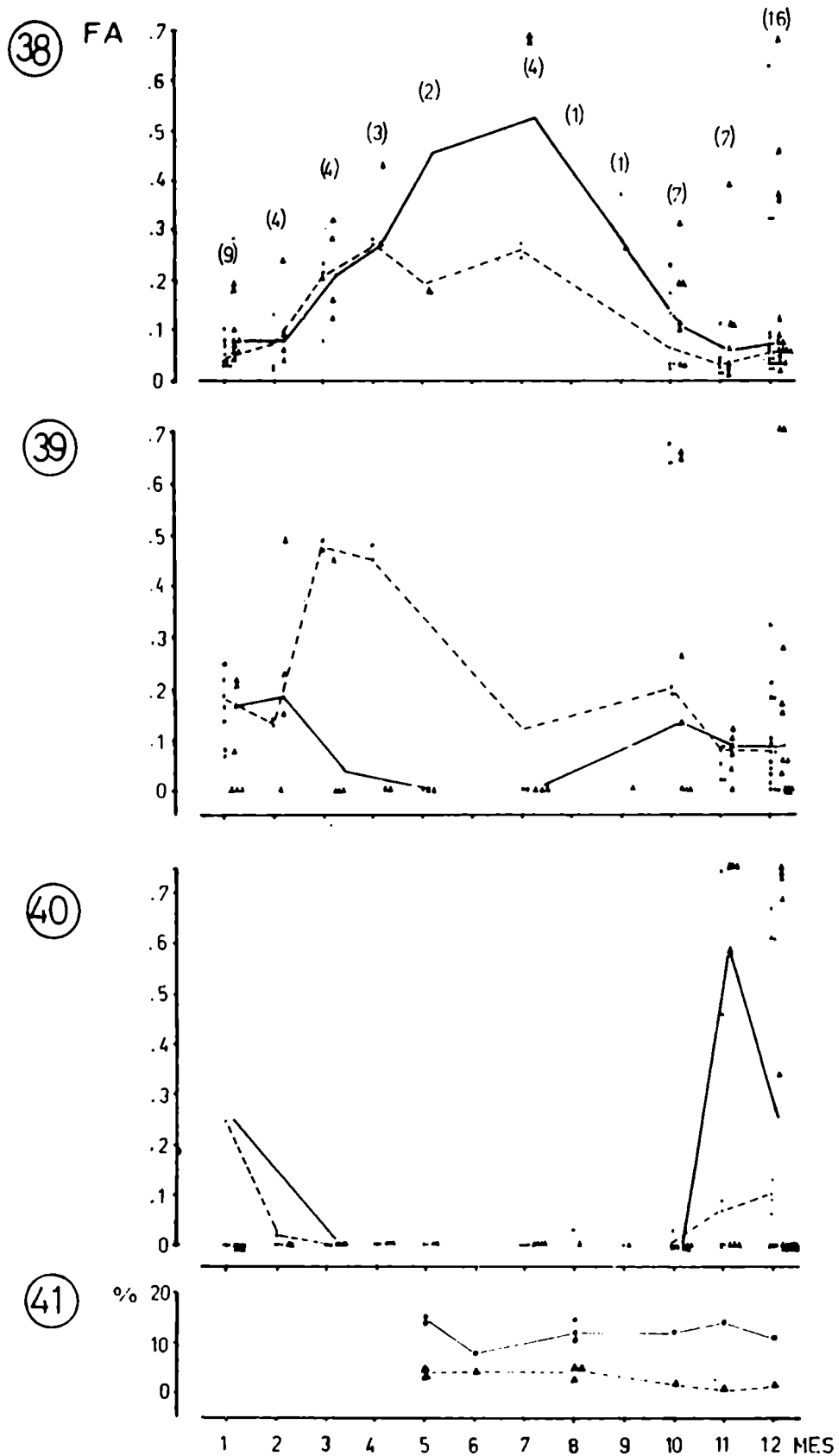


Fig. 38: Fracción de área ocupada por OII (●---●) y OIII (Δ---Δ). Las líneas indican las medianas mensuales. Entre paréntesis se indica el número de ejemplos considerados. Fig. 39: Fracción de área ocupada por OIV (●---●) y OV (Δ---Δ). Fig. 40: Fracción de área ocupada por OVI (●---●) y OVII (Δ---Δ). Fig. 41: Porcentaje del área ocupada por OI (●---●) y OII (Δ---Δ).

Recuentos efectuados en cortes histológicos han revelado que entre mayo y diciembre se observan ovogonias y ovocitos basófilos tempranos en cantidades relativamente estables (fig. 41).

El peso ovárico y el índice gonadosomático (IGS) presentan un comportamiento paralelo y evidencian el carácter cíclico de la reproducción en H.m.malabaricus (fig. 42). No obstante este carácter, se observa gran proporción de ejemplares con pesos e IGS bajos durante todo el año que reducen los valores de la mediana. En ella se manifiestan solo pequeñas diferencias estacionales. Entre marzo y mayo se superponen las curvas de las medianas y máximas mensuales marcando un período homogéneo; desde mayo se comienzan a incrementar levemente hasta el mes de setiembre a partir del cual se desencadena un crecimiento rápido, acentuándose la heterogeneidad de la población. Presenta un máximo en noviembre-diciembre y un descenso progresivo en los tres meses siguientes.

El análisis conjunto de las variaciones en cada elemento celular y el IGS permite visualizar algunas correspondencias en el ciclo ovárico (fig. 43):

El inicio del crecimiento del IGS (mayo) concuerda con niveles altos de OII y OIII (previtelogénicos), escasos OIV y ausencia de otros estadios de la ovogénesis, caracterizando un período de crecimiento previtelogénico: mayo-julio.

Desde julio se comienzan a encontrar OV caracterizando el inicio de la vitelogénesis: julio-setiembre. Desde agosto se observan algunos OVI que se hacen más nume-

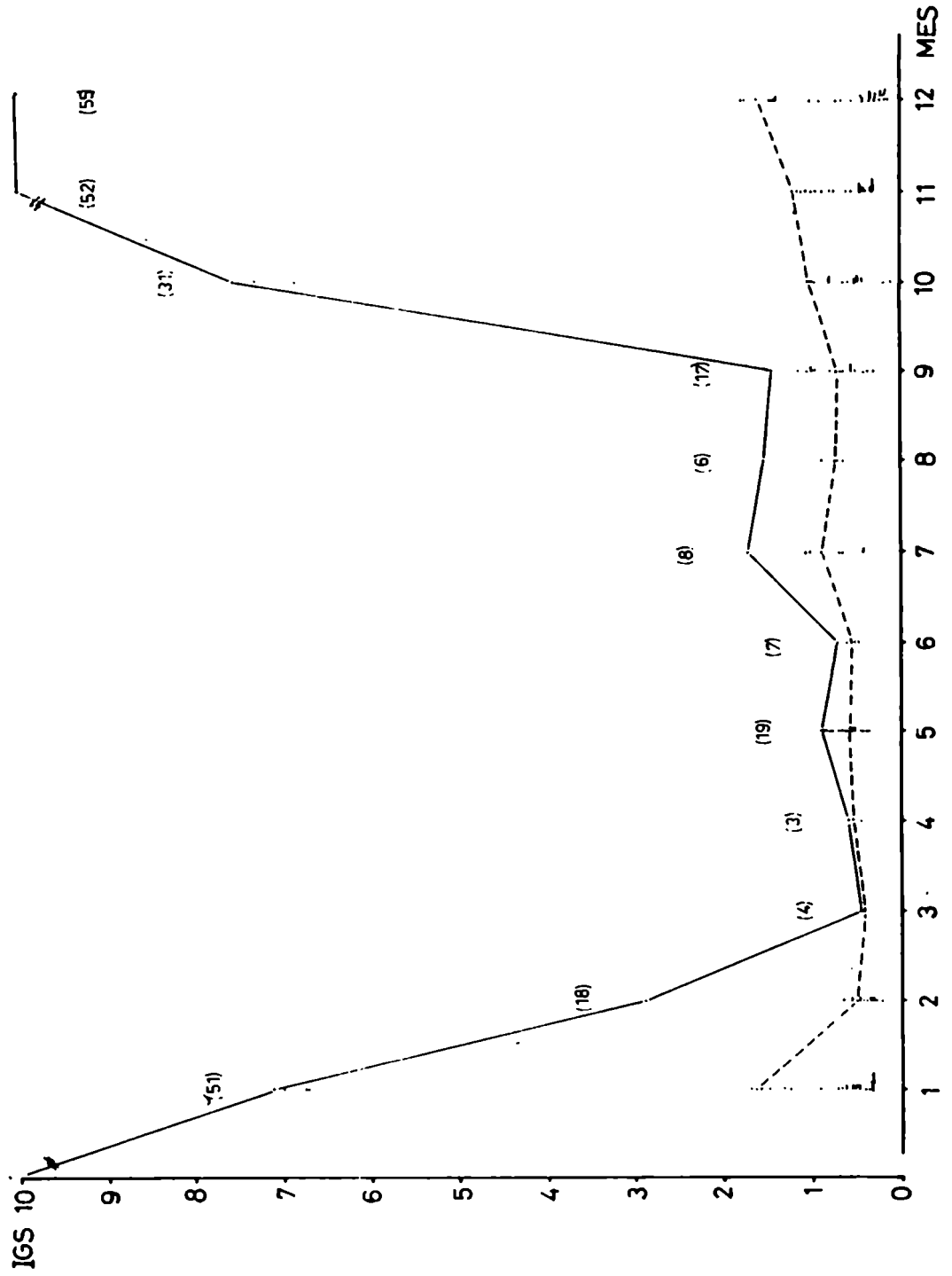
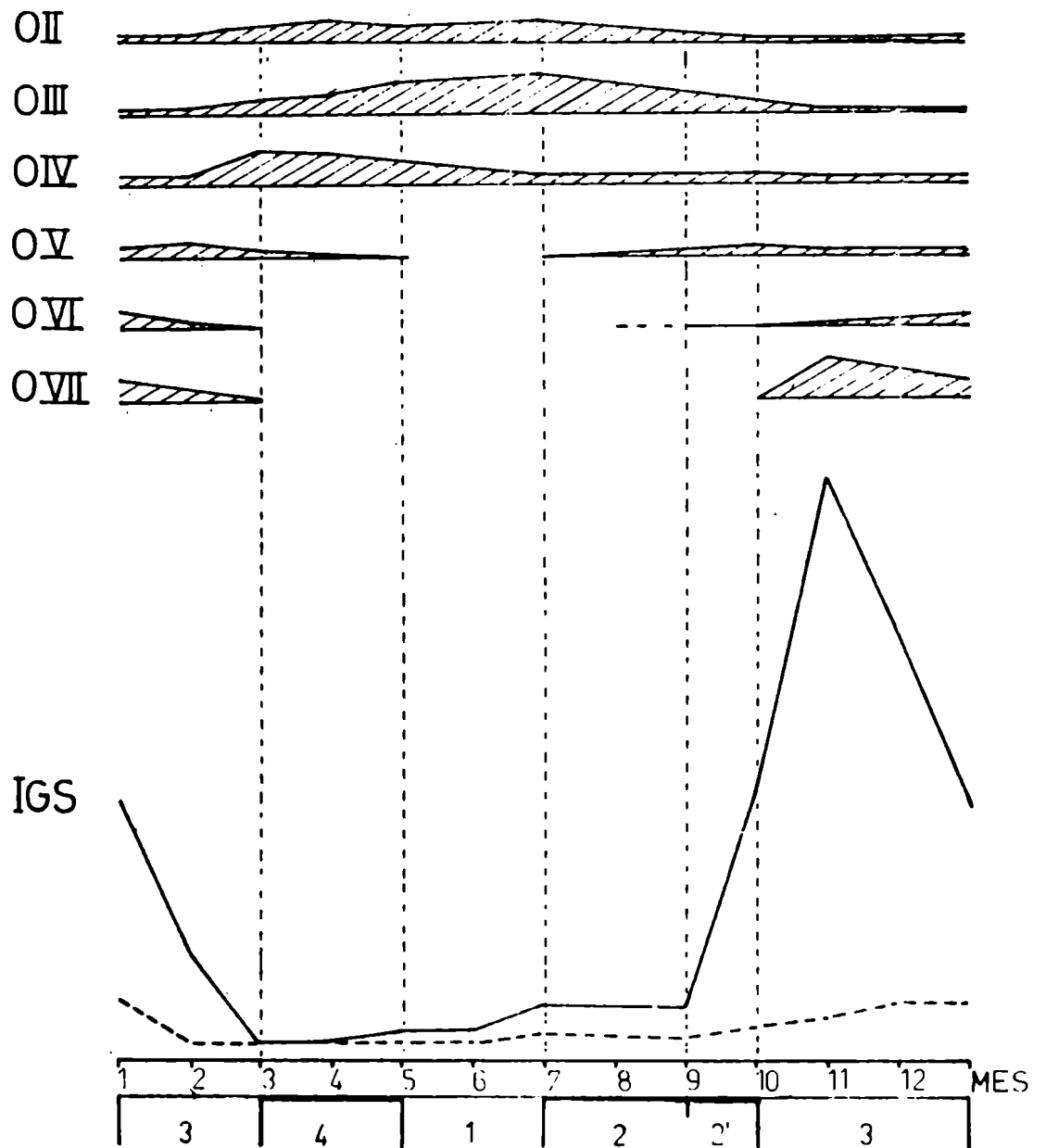


Fig. 42: Índice Gonado-romático (IGS) durante el ciclo anual. La línea llena indica el máximo mensual, la línea de trazos indica la mediana. Entre paréntesis se indica el número de ejemplares considerados.



(43)

Fig. 43: Variación mensual relativa de los distintos elementos de la ovogénesis y del IGS, el análisis conjunto permite subdividir el ciclo en los períodos de crecimiento primario y formación de los alvéolos corticales(1), vitelogénesis (2), vitelogénesis activa (2'), maduración final (3) y reparación (4).

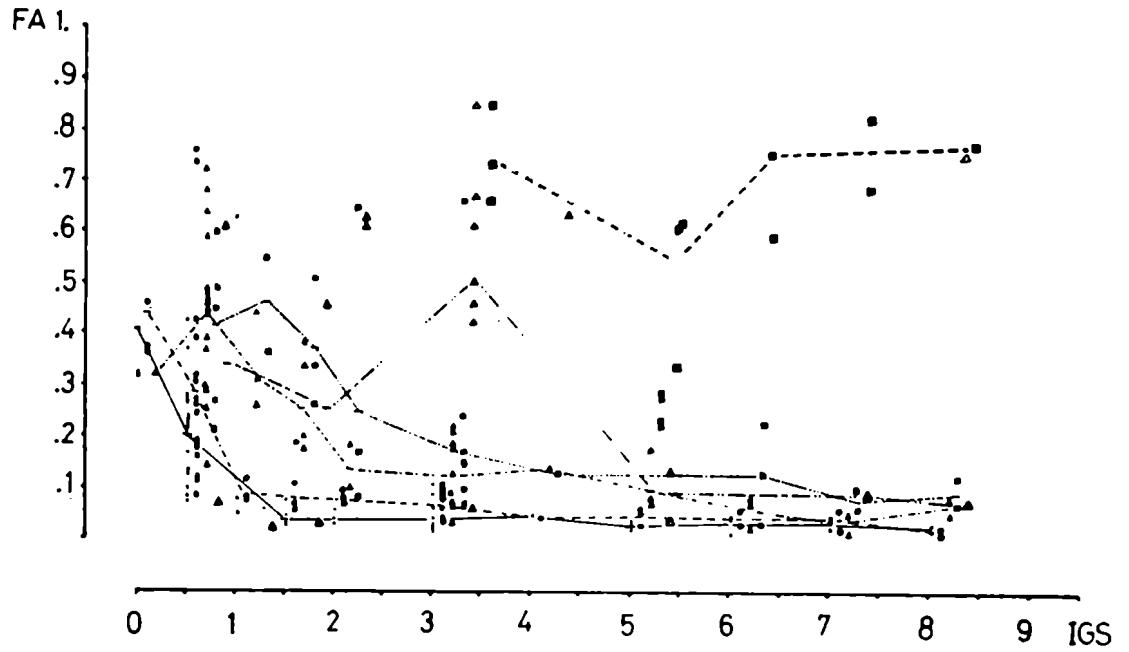
rosos en octubre definiendo un período de vitelogenénesis activa: setiembre-octubre.

En octubre ya se encuentran OVII evidenciando que la maduración final se desarrolla entre octubre-febrero.

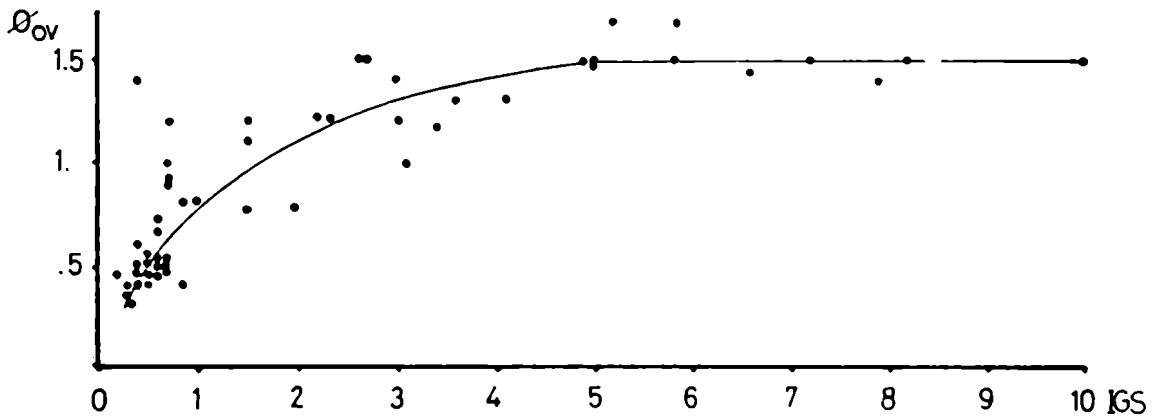
La sucesiva remoción de los estadios OVI y OV entre marzo-mayo marca el período de reparación.

La presencia de ejemplares con IGS diversos durante el período de maduración final sugiere una asincronía dentro de la población. La composición de los distintos ovarios examinados, expresada en Fracción de área (fig.44) revela que hay un sucesivo reemplazo en los estadios dominantes conforme varía el IGS. Cada estadio sigue un patrón particular. Los OII, OIII, OIV y OV presentan curvas 1/logaritmo desfasadas. Los OII presentan su máximo con un IGS próximo a 0 y luego de un decrecimiento progresivo se estabilizan entre el IGS 1,5 al 8. Un comportamiento paralelo se observa para los OIII. Los OIV, desfasados de los anteriores se encuentran en ejemplares con IGS próximo a 0 pero alcanzan valores máximos en IGS de 0,5, decrecen luego y se estabilizan entre IGS= 2-8. Los OV comienzan a observarse en ejemplares con IGS= 0,5, poseen un máximo con IGS= 1 y decrecen en forma continua. Los OVI ya son observables en IGS= 0,5 pero encuentran su máximo en IGS= 3, descendiendo, se estabilizan con valores bajos en IGS= 5-8. Los OVII se hacen presentes con IGS= 3 y permanecen relativamente estables.

(44)



(45)



(46)

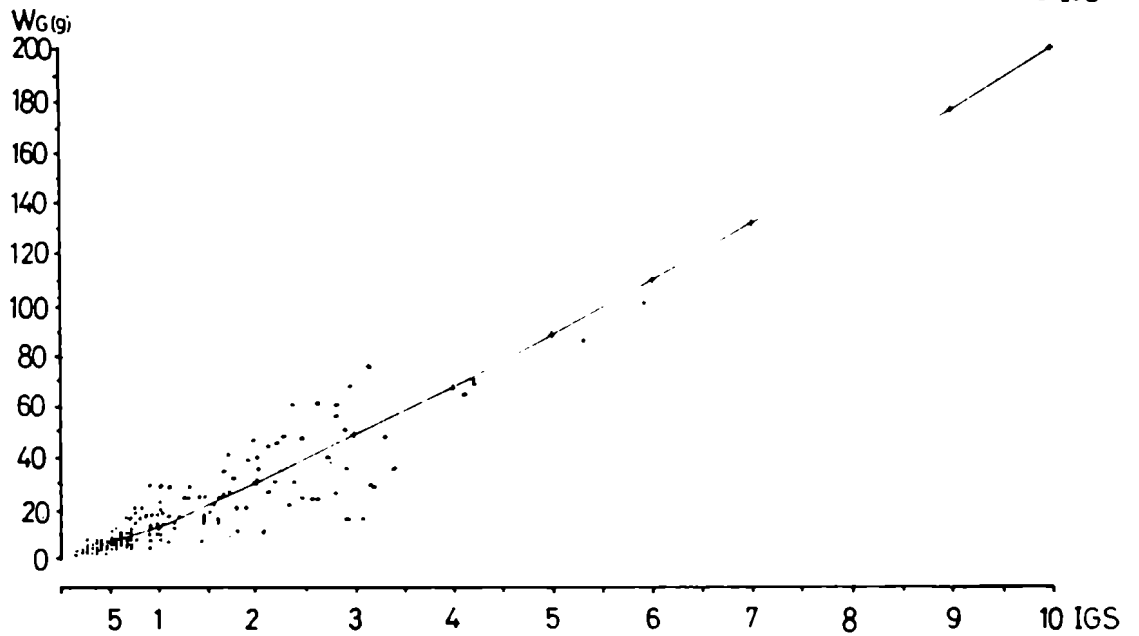


Fig. 44: Fracción de área ocupada por los distintos estadios de la ovogénesis en función del IGS. OII (●), OIII (○), OIV (▲), OV (□), OVI (△), OVII (■).

Fig. 45: Diámetro de los ovocitos más avanzados (\varnothing Ov) de cada muestra en función del IGS.

Fig. 46: Peso ovárico (WG) en función del IGS.

Se ha comprobado que existe una correlación positiva ($r = 0,83$) entre el diámetro de los ovocitos más avanzados de cada ovario y el IGS (relacionados por una función potencial) (fig. 45) que justifican las variaciones registradas en la fracción de área de la figura 44.

El peso del ovario y el IGS (fig. 46) se encuentran correlacionados ($r = 0,94$).

Los ovarios inmaduros que apenas presentan ovocitos en vitelogénesis temprana corresponden a pesos de entre 2 y 12 g con IGS de 0,5. Ovarios con índices de 0,5-3 presentan pesos de 7-98 g con ovocitos predominantemente en vitelogénesis (OV-OVI); ovarios con IGS de 3 o mayores presentan ovocitos en vitelogénesis avanzada y en maduración final correspondiendo a ovarios maduros.

Ovarios desovados colectados en la naturaleza o bien obtenidos por inducción hormonal presentan IGS entre 0,5-5, más frecuentemente IGS = 3 con ovocitos OVII ocupando más de un 40% de la gónada revelando un desove parcial. Ovarios con IGS 0,5-1,5 post-desovados solo revelan OVI pudiendo indicar un desove total.

La coloración del ovario, si bien es un carácter subjetivo, constituye un indicador: los ovarios inmaduros son blancos rosados en fresco y blancos después de fijados en formol; al iniciarse la vitelogénesis se tornan amarillentos y progresivamente el color se acerca al amarillo naranja. Los ovarios sobremaduros con ovocitos en atresia son de color ocre translúcido. Los ovarios luego del desove son flácidos color naranja sanguinolento.

La sección de los ovarios presenta cambios

relacionados con el grado de madurez. Las hembras inmaduras (IGS = 0,5) y las que se encuentran en vitelogenésis temprana (IGS = 1-1,5) poseen ovarios triangulares de 3 á 10 x 4 á 8 mm; los ovarios en vitelogenésis temprana también suelen ser de sección subtriangular con sus bordes redondeados y diámetros de 7,5 á 10 x 6 á 12,5 mm. Los ovarios en vitelogenésis más avanzada (IGS = 2-3) son de sección redondeada y diámetro 9-15 mm en tanto que los ovarios maduros (IGS > 3), también redondeados, presentan diámetros de 14-27 mm.

B.4 DISCUSION

Los teleósteos, grupo con una enorme diversidad, han desarrollado gran variedad de estrategias reproductivas. Dentro del espectro de posibilidades, Hoplias m. malabaricus, si bien posee características comunes a otras especies, también ofrece específicas peculiaridades.

Las ovogonias (OI) en H.m.malabaricus, aisladas o en nidos, son células con escaso citoplasma, núcleo voluminoso con uno o dos nucleolos al igual que lo observado por Christiansen (1971) en Merluccius hubbsi y en otras especies por Nagahama (1983). Estas células resultan semejantes a las espermatogonias de la misma especie y a las células de ejemplares indiferenciados (tablas 2 y 3) homólogo a lo encontrado en otras especies (Nagahama, 1983). En cambio Wallace y Selman (1981), en F.heteroclitus reconocen, con las características antes detalladas, a los ovocitos en su fase más temprana de desarrollo es decir la "chromatin nucleolar phase".

La etapa sucesiva, de ovocito basófilo (OII), en H.m.malabaricus se considera el inicio del crecimiento primario y presenta características similares a las señaladas para Scomber (Bara, 1960), Pimelodus (Godinho et al, 1974), Barbus (Al Daham y Bhatti, 1979), Geophagus (Barbieri et al, 1981). Corresponden de acuerdo a lo señalado por Wallace y Selman (1981) a los ovocitos arrestados en diplotene que presentan varios nucleolos (amplificación de genes ribosomales) en el "perinucleolar stage".

En una etapa temprana de los OII de H.m.malabaricus se evidencian cromosomas plumulados, en forma semejante a lo indicado por Bara (1960) para Scomber, y en conjunto con un incremento en la basofilia citoplasmática relacionada con ARN citoplasmático y proteínas lo que recompone el cuadro observado por Calvo et al (1968) en Basilichthys (Odontesthes) bonariensis.

El núcleo vitelino, en H.m.malabaricus, es esencialmente proteico; en T.tinca también se reconoce un gran acúmulo de proteínas que serviría para la multiplicación mitocondrial (Tourey et al, 1977). En varias especies se reconoce una ultraestructura muy particular vinculada con los procesos de replicación de organelas y materiales necesarios para la vitelogénesis (Beams y Kessel, 1973; Guraya, 1979; Wallace y Selman, 1981).

El período de vitelogénesis endógena (OIII) de H.m.malabaricus se desarrolla según lo descrito para la mayoría de las especies ictícolas verificándose asimismo que las vesículas vitelinas se movilizarían para la formación de los alveolos corticales según ya ha sido observado

en otras especies (Anderson, 1968; Shackley y King, 1977; Khoo, 1979; Wallace y Selman, 1981; Nagahama, 1983; Bun Ng e Idler, 1983; Selman et al, 1986). Estos alveolos corticales de teleósteos serían análogos a los gránulos corticales de Invertebrados y otros Vertebrados que intervendrían en los procesos de fertilización (Yamamoto, 1964).

La etapa de vitelogénesis exógena en H.m. malabaricus se reconoce por la presencia de gránulos lipoproteicos dispuestos en un comienzo periféricamente (OIII, 3), luego se distribuyen en el interior del ovocito y forman gránulos vitelinos. Estos en lo sucesivo darán origen a las plaquetas que, según Nagahama (1983), en conjunto deberían denominarse "glóbulos vitelinos". La secuencia descrita se verificaría en los teleósteos por la incorporación de vitelogenina hepática (Bailey, 1957; Wallace, 1978) por micropinocitosis y su posterior crecimiento por fusión (Droller y Roth, 1966; Anderson, 1968; Ulrich, 1969; Gupta y Yamamoto, 1972; Shackley y King, 1977).

La etapa de maduración ovocitaria en H.m. malabaricus se verifica por la migración de la vesícula germinal hacia el polo animal (OVII) y su posterior ruptura que marca la reanudación de la meiosis (OVIII), análogamente a lo señalado por Goetz (1983) para otras especies.

En H.m. malabaricus, durante la migración de la vesícula germinal parece permanecer conectada con el citoplasma perinuclear y aparentemente hay un huso que tracciona al núcleo a la periferia micropilar.

La fusión de las plaquetas vitelinas, que es una de las características de la maduración ovocitaria,

presenta una gama muy amplia de variabilidad entre las distintas especies. H.m.malabaricus pertenece al grupo que no presenta coalescencia vitelina en tanto que la mayoría de las especies la presentan de manera total o parcial (Wallace y Selman, 1981; Goetz, 1983).

Durante esta etapa de maduración del ovocito de H.m.malabaricus se verifica un cambio morfológico en las células de la granulosa; en efecto, las células se presentan más activas con citoplasma granulado, según Goetz (1983) en F.heteroclitus este cuadro estaría relacionado con la síntesis de un activador de la meiosis.

La membrana del ovocito de H.m.malabaricus posee una "zona radiata"; esta zona también recibe otras denominaciones en otras especies (Nagahama, 1983) y es considerada como una membrana primaria, producida por el ovocito (Anderson, 1967). En H.m.malabaricus es la primera en aparecer; de naturaleza glicoproteica, no difiere de la ya descrita en otros grupos (Nagahama, 1983). Más externamente a esta zona radiata se encuentra una segunda capa también glicoproteica denominada "zona externa" que se podría considerar como una diferenciación de la zona radiata y por lo tanto parte de la membrana primaria, o bien reconocer su origen en las células de la granulosa en cuyo caso se la clasificaría como una membrana secundaria (Anderson, 1967). Esta última posibilidad resultaría más probable teniendo en cuenta que se constituye después de haberse formado la zona radiata. Producida la ovulación la estructura de la zona externa parecería cambiar, obturando los canales presentes en el ovocito intrafolicular. Además, por su naturaleza gli-

coproteica podría permitir la adhesividad que entre si presentan los ovocitos desovados, de modo de formar la característica masa compacta del desove que observara Ramirez (1963) en los nidos de H.m.malabaricus.

Cabe señalar que en otras especies la formación de la membrana externa a la zona radiata tiene diverso origen. En trucha el ovocito presenta una delgada zona periférica, electrodensa al ME, que parece constituir parte de la zona radiata (Hurley y Fisher, 1966); en cambio el ovocito de Rhamdia presenta un grueso corion gelatinoso formado por destrucción de las células foliculares (Cussac y Maggese, 1985) también de naturaleza glicoproteica pero con contenido lipídico, de modo análogo a lo que se observa en Cichlasoma (Busson Mabillot, 1977). En cuanto a H.m.malabaricus, por las características ovocitarias señaladas, el origen de la membrana externa no ha podido ser todavía aclarado y constituye en la actualidad un tema de análisis.

Aspectos dinámicos:

El tamaño de los ovocitos maduros de H.m.malabaricus es de alrededor de 1,7 mm, considerado como normal para los Cypriniformes (Battle, 1940; Freyre y Togo, 1967; Durand y Loubens, 1971; Long y Ballard, 1976) e intermedio entre otros teleósteos. En efecto, los huevos de Cymatogaster aggregata miden 0,3 mm en tanto que los de trucha alcanzan 5 mm, existiendo especies con ovocitos mayores como Bagre marinus con 20 mm (Wallace y Selman, 1981).

Un aspecto relacionado con el tamaño final de los ovocitos es el de la hidratación, como fase de la ovo-

génesis, que en H.m.malabaricus es de aproximadamente un 12%. Considerada poco importante, se encuentra acorde con la condición de formar desoves demersos y que contrasta con los huevos pelágicos (principalmente marinos) en los cuales la hidratación adquiere mayor importancia, alcanzando un 60% en Testogolabeus adpersus (Wallace y Selman, 1981) y un 50% en Chanos chanos (Kuo y Nash, 1979).

Durante los períodos de vitelogénesis activa, maduración final y reparación se encuentran ejemplares con IGS muy diversos que evidencian una gran asincronía reproductiva en la población. Durante el período de reproducción se observan ovarios maduros y en maduración en proporciones del 50% del total muestreado, sugiriendo que durante ese período hay un sucesivo reemplazo de los reproductores los que desovarían, total o parcialmente, y luego de una nueva fase de maduración entrarían nuevamente en reproducción. Acorde a lo observado en esta misma especie por Pinto Paiva (1972), los ejemplares maduran progresivamente resultando desoves parciales a intervalos de quince días. Esta hipótesis es sostenida por la presencia de un estadio de post-desove o semidesovado (Calvo et al, 1966; Caramaschi et al, 1982).

Los ovarios de H.m.malabaricus presentan siempre ovocitos en estadios previtelogénicos (OII y OIII 1 y 2) y es común encontrar OIV, es decir en vitelogénesis temprana. Los ovocitos OV (vitelogénesis tardía) corresponden al primer estadio discontinuo durante el ciclo anual, indicando que el "reclutamiento" se efectuaría durante esa fase, coincidiendo con lo observado en arenques (Bowens y

Holliday, 1961). A partir del reclutamiento se encuentran en ovarios con IGS = 2 (en vitelogénesis), poblaciones de OV y OVI que son dominantes sobre los ovocitos menos desarrollados; esta condición se mantiene conforme aumenta el IGS adquiriendo predominancia las poblaciones de OVII.

Los ovarios de H.m.malabaricus, durante la reproducción, presentan un grupo de ovocitos más desarrollados (VII) que son volumétricamente dominantes sobre un acúmulo de estadios (OII, OIII, OIV, OV) que se mantienen ocupando un volumen reducido. Esta característica los ubica en el grupo de los "ovarios sincronos por grupos" que habitualmente desovan en una temporada reproductiva breve y que es común en la mayor parte de las especies de teleósteos (Wallace y Selman, 1981). Las poblaciones de ovocitos dominantes, denominadas "clutch", son perfectamente identificables en los ovarios con IGS > 5, en los cuales dominan los OVII; los ovarios con IGS = 3-5 presentan alguna mezcla entre los OVII, OVI y OV correspondiendo a ejemplares recientemente desovados o que están reiniciando la maduración.

La variedad de ciclos ováricos se hace evidente en los teleósteos refiriendo solo algunos ejemplos que contrastan marcadamente con H.m.malabaricus. Barbus luteus luego de un período postreproductivo en el cual una atresia activa remueve sucesivamente los ovocitos más maduros y luego los inmaduros, presenta un estadio de arresto ovárico con sólo OII (Al Daham y Bhatti, 1979). Algo similar sucede en Chanos chanos, destacando también que coexisten du-

rante el período reproductivo ovarios maduros e inmaduros dentro de la población a pesar de ser del tipo sincrónico (Kuo y Nash, 1979). En contraste Cyprinus carpio presenta vitelogénesis durante casi todo el año y un rol muy importante de la atresia en todos los períodos (Bienarz et al, 1979). Por otra parte, Fundulus heteroclitus, con ovarios asíncronos, desova continuamente durante la temporada reproductiva ovocitos que son "reclutados" en la fase de maduración final (Wallace y Selman, 1980 y 1981).

La tabla de maduración ovárica, que de este trabajo resulta, se condensa en la tabla 1. Los estadios de "previtelogénesis" y "vitelogénesis" coinciden con los de "premaduración" y de "principio de maduración" de Calvo et al (1966) salvo en el IGS que en ambos estadios es menor en nuestro estudio. El estadio "maduro" de Caramaschi et al (1982) es muy amplio, incluye a los estadios "maduro" y de "maduración avanzada" de Calvo et al (1966). A este último corresponde el de "vitelogénesis" activa, definido en el presente trabajo, a pesar de las diferencias en el IGS y del período en el cual se lo encuentra. El estadio "maduro" de Calvo et al (1966), que fuera anticipado pero no descrito por estos autores, se encuentra ahora definido por el estadio de "maduración final". El estadio "semidesovado" coincide con los ya descritos, encontrando diferencias en la presencia de OVII remanentes y en consecuencia IGS mayores; el período en el que se puede encontrar este estadio ha sido ampliado a noviembre-marzo. En el estadio "desovado" hemos encontrado ovocitos IV a VI como dominantes durante toda la temporada reproductiva, evidenciando que también

hay ejemplares que desovan toda la dotación de OVII ; luego durante el período de reparación se reducen gradualmente los estadios más maduros hasta que queda una alta proporción de OIV. Los estadios equivalentes de "regresión ovárica" (Calvo et al, 1966) y "desovados" (Caramaschi et al, 1982) son "relativamente" equivalentes, dado que el primero se limita a una fracción de la etapa post-reproductiva.

C. LA HIPOFISIS COMO ORGANO REGULADOR

C.1 INTRODUCCION

La regulación de la actividad reproductiva es ejercida por el sistema nervioso central, a través de los órganos sensoriales, cerebro, hipotálamo, hipófisis y finalmente las gónadas.

En las distintas especies la actividad hipofisaria es regulada por neurohormonas de origen hipotálamico y por retroalimentación de las hormonas gonadales exhibiendo un ciclo estacional que se evidencia en cambios citológicos de la hipófisis (Van Oordt y Peute, 1983).

En general, en la hipófisis se reconocen macro y microscópicamente, la neurohipófisis (NH) y la adenohipófisis (AH). Entre los teleósteos se consideran dos tipos estructurales principales: los Platibásicos, en los que la NH, representada por el piso del infundíbulo, emite procesos hacia la AH discoidal (Ej.: anguilas) y los Leptobásicos, que poseen un tallo infundibular bien definido y una AH globular u ovoide (Ej.: salmónidos). Es común, también, que la adenohipófisis de los teleósteos presente tres áreas con distintas células tróficas: "pro", "meso" y "meta" adenohipófisis (Pickford y Atz, 1957) o bien: Pars distalis rostral (PDR), pars distalis proximal (PDP) y pars intermedia (PI) (Van Oordt y Peute, 1983). La neurohipófisis posee una extensa interrelación con las tres áreas suplantando el sistema porta que normalmente existe en Vertebrados (Sage y Bern, 1971).

Las investigaciones inherentes a la hipófisis, han abarcado varios aspectos: la identificación histológica de las distintas células tróficas, aspectos histofisiológicos ligados al ciclo anual y a perturbaciones experimentales, así como aspectos inmunocitoquímicos, seriamente limitados por la disponibilidad de hormonas homólogas (Van Oordt y Peute, 1983) y finalmente los aspectos de la regulación de la secreción de gonadotrofinas (Peter, 1983; de Leeuw, 1985).

Adoptando criterios citológicos tales como granulación, reacción a colorantes, naturaleza química, morfología y relativa ubicación topográfica en la hipófisis, se pueden identificar distintos tipos celulares (Ball y Baker, 1969). Se reconocen: células prolactínicas (μ o eritrosinófilas) o paralactínicas, en la PDR; células adenocorticotrofas (ϵ o células x) o corticotrofas ubicadas entre la PDR rodeando la rama anterior de la neurohipófisis; células productoras de la hormona del crecimiento (α o somatotropas) o GH o STH, acidófilas de la PDP; células gonadotropas (β y γ), basófilas de la zona ventral de la PDP, reconociéndose a veces un solo tipo (Sundararaj, 1959; Leatherland, 1969, 1970; Peute et al, 1976) y otras veces dos tipos celulares (Olivéreau y Ridgeway, 1962; Olivereay, 1963 a y b; Cook y Overbeeke, 1972; Leatherland, 1972) según las especies. También se reconocen variaciones funcionales que permiten agrupar las células en basófilas granuladas, cisternales y degranuladas (Van Oordt y Peute, 1983); células tireotropas (δ , TSH), basófilas de la PDP. En la PI se encuentran uno o dos tipos celulares y una gran cantidad de

ramas de la neurohipófisis cuyo rol fisiológico es probablemente melanoforotrófico (Ball y Baker, 1969).

La identificación de las células productoras de gonadotrofina ha sido llevada a cabo en distintas especies ictícolas mediante técnicas de diversa complejidad y exactitud. Sin embargo, el suborden Characoidei ha sido escasamente estudiado en este campo; se cuenta en este caso con la descripción de la adenohipófisis de Pseudocurimata gilberti, en base a características tintoriales y a la observación de cambios citológicos relacionados con el ciclo sexual (Morriconi y Calvo, 1974).

En grupos emparentados como el suborden Ciprinodei y el orden Siluriformes, se han efectuado extensas observaciones detectando "aumentos en la abundancia relativa de las células basófilas" de Carassius auratus (Ciprinodei) (Munkittrick y Leatherland, 1984). En Heteropneustes fossilis (Siluriformes) las células basófilas de la PDP fueron caracterizadas como gonadotrofas (GTH) a través de su relación con el ciclo gonadal (Sundararaj, 1959, 1960) y con los cambios hipotalámicos (Viswanathan y Sundararaj 1974) así como por la respuesta a tratamientos hormonales y ovariectomía (Sundararaj y Goswami, 1968; Anand y Sundararaj, 1975). En Clarias lazera (Siluriformes) las células GTH fueron reconocidas a nivel ultraestructural e inmunocitoquímico (Peute et al, 1984). Rhamdia hylarii (Siluriformes) presenta un solo tipo de célula GTH caracterizada morfológica, citológica y citoquímicamente, por variaciones funcionales que originan células granuladas (o no

vacuoladas) y células vacuoladas (Val-Sella y Fava de Moraes, 1979 a y b; Val-Sella y Sasso, 1980 a y b). Rhamdia sapo (Siluriformes) también presenta un solo tipo de célula gonadotrófica y características semejantes a R.hilarii (Cussac y Maggese, 1984).

En los estudios de Nagahama y Peter (1982) que se refieren a la síntesis de precursores de la gonadotropina (Gnh) se establece el papel que desempeñan las grandes cisternas del retículo endoplásmico rugoso (RER) presentes en las características células vacuoladas o cisternales. Estos mismos autores, mediante la destrucción de áreas hipotalámicas, constatan el aumento de los niveles séricos de Gnh, acompañados por la presencia de numerosas células degranuladas y por grandes dilataciones del RER. Cisternas análogas se encuentran en ejemplares castrados (Borg et al, 1985) y pueden observarse aún en las células degranuladas (o no vacuoladas), cisternas de pequeño tamaño (Val Sella y Sasso, 1980 a y b).

C.2 MATERIAL Y METODOS

Hipófisis de ejemplares de ambos sexos de H.m.malabaricus, colectados en forma periódica entre 1984 y 1988, fueron procesados para microscopía óptica, con el fin de reconocer los tipos celulares y detectar las eventuales variaciones histológicas relacionadas con el ciclo reproductivo.

Las glándulas fueron extraídas separando la bóveda craneana y removiendo el cerebro; han sido fija-

das en líquido de Bouin por 12-24 horas, deshidratadas, aclaradas en xilol o cloroformo e incluidas en parafina-cera de abejas. Los cortes sagitales y seriados de 5 μ m fueron coloreados con:

1. Hematoxilina de Ehrlich - eosina (HE) (Locquin y Lageron, 1985)
2. Paraldehido-fucsina de Elftman (mezcla de Gomori) (AF) (Halmi, 1952)
3. AB - PAS - OG (APO) (Gabe, 1968)
4. Alcian blue pH 2,5 (AB) (Pearse, 1985)
5. APS (PAS) (Pearse, 1985)
6. Orange G (OG)

Se usaron las coloraciones 2 y 3 de uso corriente para teñir cortes de hipófisis fijadas en Bouin o en Bouin-Hollande, dado que las células conocidas como gonadotrofas son basófilas, PAS + (por su contenido glicoproteico) y con cantidad variable de gránulos AB +, AF + (reacción con grupos ácidos expuestos luego de una oxidación fuerte) (Sokol, 1961; Olivereau, 1967; Ball y Baker, 1969; Van Oordt y Peute, 1983; Farbridge et al, 1985).

Con el fin de caracterizar las variaciones en las presuntas células gonadotrofas, se procedió al conteo de las células presentes en la PDP, es decir de las basófilas AB + y PAS +, considerando los tres estadios funcionales: células densamente granuladas, cisternales y escasamente granuladas (en conjunto con las cromófobas) y de las células OG +. Se tomó como criterio contar la franja ventral de la PDP para evitar incluir las basófilas dorsales

de función probablemente tireotrofa, de acuerdo a lo observado en otras especies (Van Cordt. y Peute, 1983; Farbridge et al, 1985). Además no se consideró la franja periférica ya que en ella se encuentran células más intensamente teñidas. Se eligieron, con aumentos bajos (100 X), zonas que tuvieran predominio de células basófilas y con aumento de 1250 X (utilizado para los recuentos) se corrigió la ubicación para evitar los vasos sanguíneos. En cada corte se contó el número de células de cada tipo, presentes en un campo de $10.000 \mu\text{m}^2$, repitiendo el conteo en 10 campos en distintos cortes elegidos al azar, expresando los resultados en porcentajes.

En el caso de los machos los resultados fueron agrupados de acuerdo con el período del ciclo anuo previamente determinado: Proliferación, inicial (mayo-junio) y final (agosto-setiembre); Preparación (primera quincena de octubre); Reproducción, inicial (segunda quincena de octubre) y plena reproducción (noviembre-diciembre); Reparación (segunda quincena de febrero-abril).

En el caso de las hembras, los resultados fueron agrupados de acuerdo con el estado de maduración del ovario: Previtelogénesis (ovarios hasta 10 g), Vitelogénesis (ovarios hasta 50 g, sin OVII), Maduración final (ovarios con OVII) y Desovados.

En ambos casos se efectuaron tests de Anova para detectar diferencias significativas entre los distintos períodos y análisis de correlación respecto del IGS y diferentes elementos celulares claves (Sokal y Rohlf, 1969).

C.3 RESULTADOS

a) Anatomía

La hipófisis de H.m.malabaricus es de forma aproximadamente oval; su peso, en ejemplares entre 1000 y 2500 g, oscila entre los 7 y 16 mg, con un promedio de 11,61 mg. Ubicada debajo de la porción hipotalámica del cerebro, se aloja en una foseta del piso de la bóveda craneana. Se encuentra conectada con el hipotálamo por un corto tallo pituitario, a través del cual penetran los filetes nerviosos de la neurohipófisis y los vasos sanguíneos (fig. 47).

La neurohipófisis, en contacto con la adenohipófisis, se ramifica principalmente a nivel de la pars intermedia. La adenohipófisis presenta tres zonas diferentes denominadas por su similitud con las de otros teleósteos, pars distalis rostral (PDR), pars distalis proximal (PDP) y pars intermedia (PI) (fig. 47), de acuerdo a la nomenclatura de Gorbman (1965, en Ball y Baker, 1969).

La membrana que recubre la hipófisis es mono o bicelular plana. Por debajo de la misma se ubican células tróficas y una conspicua red de capilares que determina una irrigación muy profusa.

Los resultados de las diferentes tinciones y las dimensiones celulares se condensan en la tabla 7.

- La Pars distalis rostral (PDR), fig. 48, tabla 7, presenta células debilmente teñidas por el orange G (probablemente correspondan a las células M), dispuestas

CELULA- PORCION	BASOFILA	ACIDOFILA	COLORANTE				FORMA
			PAS	AB	AF/OG	OG	
\mathcal{M} -PDR			* (gr+)	* (gr+)	++	+	CILINDRICA
\mathcal{L} -PDR			++	-	+	(+)	POLIEDRICA CILINDRICA
α -PDP	-	+	+	+	++	+++	POLIEDRICA ESFERICA
b -PDP	+	-	+++	+++	+	-	POLIEDRICA ESFERICA
c -PDP PI	gr.+	-	gr+	-	gr+	-	POLIEDRICA ESFERICA
d -PI	gr.+	-	-	-	-	+	POLIEDRICA
e -PI	+	-	+++	-	+	-	POLIEDRICA
NS-NH	+	-	+++	+++	+	-	-

Tabla 7: Características tintoriales de las células de la hipófisis. Ref: (*) solo en contacto con la neurohipófisis.

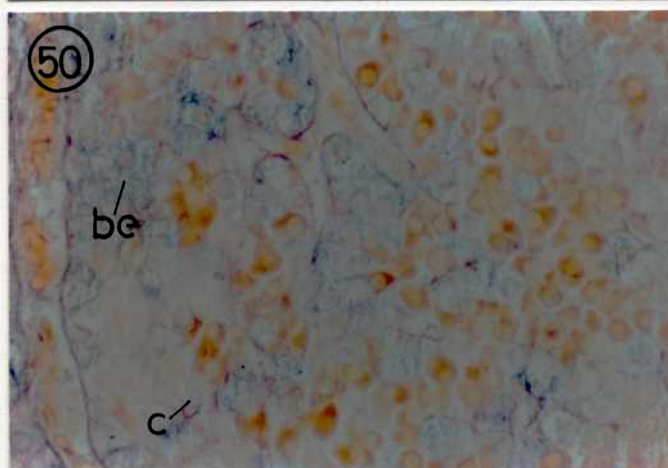
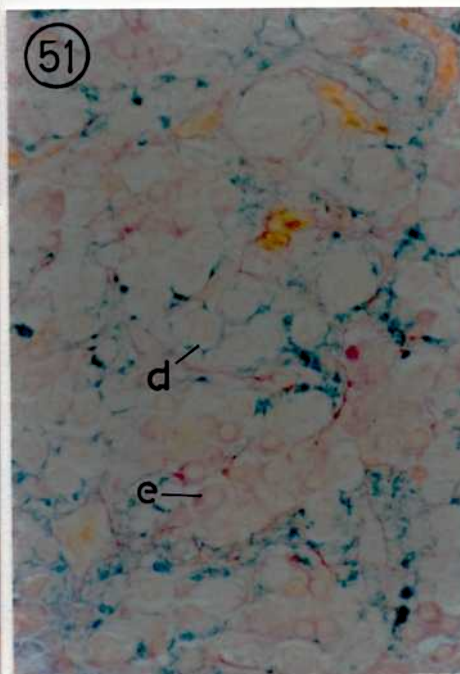
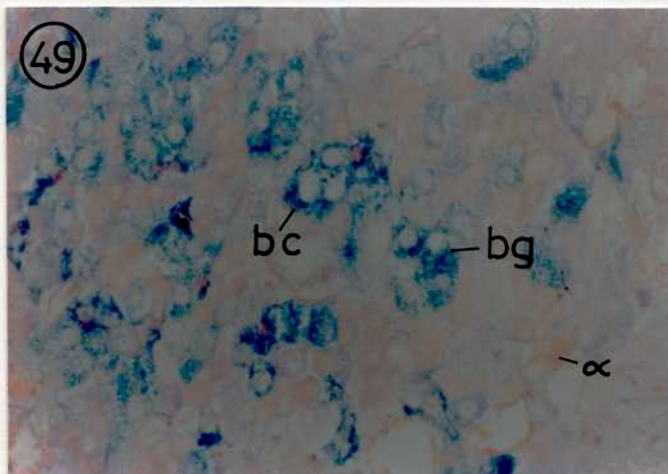
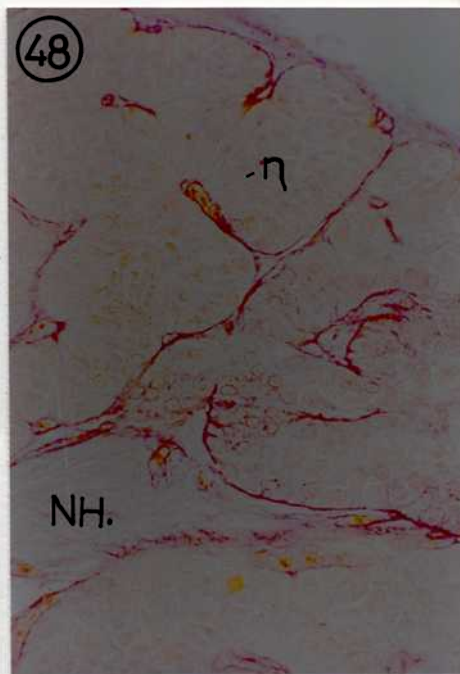
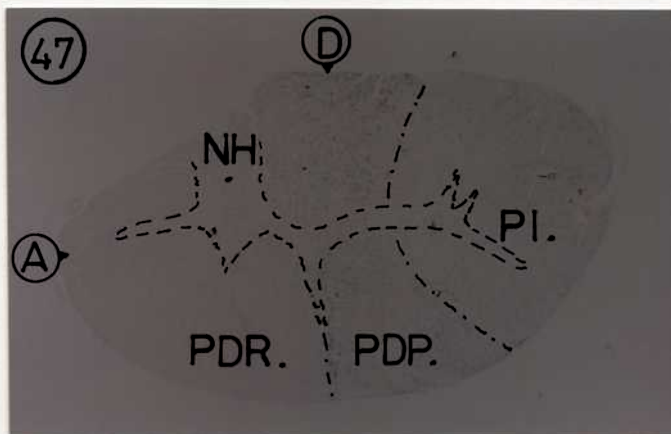


Fig. 47: Corte sagital de la hipófisis. 40X, PAS-AB-OG. Fig. 48: Pars distalis rostral. 800X, PAS-AB-OG. Fig. 49: Pars distalis proximal. 800X, PAS-AB-OG. Fig. 50: Pars distalis proximal. 1000X, PAS-AB-OG. Fig. 51: Pars intermedia. 800X, PAS-AB-OG. Ref: Pars distalis rostral (PDR); Pars distalis proximal (PDP); Pars intermedia (PI); Neurohipófisis (NH); Células η (η); Células α (α); células basófilas granuladas (bg); células basófilas escasamente granuladas (be); células basófilas cisternales (bc); células e (e); células d (d); Dorsal (D); Anterior (A).

alrededor de capilares sanguíneos, en forma radiada. Algunas de estas células también están en contacto con filetes de la neurohipófisis presentando material basófilo denso en esa área (AB, PAS y AF-OG +). En cambio la porción que circunda a los capilares es más acidófila.

Existen poblaciones de células en contacto con la NH, especialmente en la PDR dorsal, por cuya tinción PAS + podrá representar un segundo tipo celular (E).

- La Pars distalis proximal (PDP), fig. 48 y 50 tabla 7, está formada por tres tipos celulares: dos basófilos y uno acidófilo. Este último, OG + (α), se encuentra difundido por toda la PDP, con mayores concentraciones en la zona central o medular, en proximidades de los filetes de la NH. Los dos tipos basófilos presentan diferente afinidad tinto-rial: 1) el primero consta de células AB y PAS + (b) agrupadas en la periferia de la PDP y relativamente dispersas en la zona central. Estas células basófilas evidencian aparentes variaciones funcionales que permiten agruparlas en: 1) células basófilas densamente granuladas (bg) (fig. 49), con gránulos AB + ocupando el citoplasma, el núcleo permanece central, 2) células basófilas escasamente granuladas (be) (fig. 49): también presentan gránulos AB + en escasa proporción, el citoplasma puede ser leve o marcadamente PAS +. 3) células basófilas cisternales (bc) (fig. 50): poseen una o dos vesículas de gran tamaño que desplazan al núcleo, éstas en ocasiones presentan precipitados PAS + u OG +. En el citoplasma también se hallan gránulos AB + en proporción variable.

II) El segundo tipo de células se encuentra en escasa proporción y esparcido en la PDP presentando un citoplasma cromóforo y algunos gránulos PAS + (c) (fig. 49).

- La Pars Intermedia (PI), Fig. 51, Tabla 7, posee tres tipos celulares y abundante neurosecreción AB +, así como cuerpos de Herring (Ball y Baker, 1969) correspondientes a terminaciones neurosecretoras engrosadas. El primer tipo corresponde a células PAS y AF-OG + (e) que se encuentran formando acúmulos pequeños y abundantes entre los que se disponen cordones del segundo tipo celular consistente en células orange G + (d). Entre estos dos tipos se disponen pocas células cromóforas con gránulos PAS +, semejantes a las de la PDP (c).

No se han observado signos de atresia celular, figuras mitóticas o división celular amitótica.

b) Características funcionales de la Pars Distalis Proximal:

Machos:

El análisis del número total de células basófilas por unidad de área evidencia diferencias significativas durante el "período de preparación" (tabla 8); estas diferencias, debido a la falta de figuras mitóticas o atresias, se atribuyen a variaciones de volumen celular. Se ha registrado que durante el período de preparación las células basófilas cisternales predominan, en tanto que durante el "período de reproducción" las células basófilas, densamente granuladas, se encuentran en porcentaje significativamente mayor. Las células basófilas escasamente granuladas son numerosas durante el "período de proliferación" y en el de la "repa-

PERIODO	PROLIFERACION		PREPARACION	REPRODUCCION		REPARACION
	INICIAL	FINAL		INICIAL	FINAL	
MES Nº	5-6	8-9	10(1ºQ)	10(2ºQ)	11-12	2(2ºQ)-3
TALLA (mm)	410-500	415-470	500-550	370-415	405-520	385-560
PESO TOTAL (gr)	850-1555	950-1375	1800-2100	600-950	975-1825	825-2400
% BASOF. TOTALES	68	67	81	66	74	62
% BASOF. DENS. GR.	16	17	14	20	37	14
% BASOF. CISTERN.	3	7	35	12	7	5
% BASOF. ESC. GR.	49	41	32	34	29	43
CELS. α	32	33	19	34	26	38

Tabla 8: Ciclo de las células de la PDP de ejemplares machos.

PERIODO	PREVITELOGENESIS	VITELOGENESIS	MADURACION FINAL	DESOVADOS
MES Nº	8, 10, 12	10, 12	1, 11	1, 11
TALLA (mm)	425-485	440-565	410-575	440-550
PESO TOTAL (gr)	1100-1400	900-2400	1725-2550	950-2500
PESO OVAR. (gr)	4-8	36-46	67-100	16-29
IGS	0,36-0,64	1,95-4,17	4,04-4,08	0,64-3,15
% BASOF. TOTALES	73	85	74	75
% BASOF. DENS. GR.	11	4	29	7
% BASOF. CISTERN.	12	45	11	10
% BASOF. ESC. GR.	51	36	34	58
CELS. α	27	15	26	25

Tabla 9: Ciclo de las células de la PDP de ejemplares hembras.

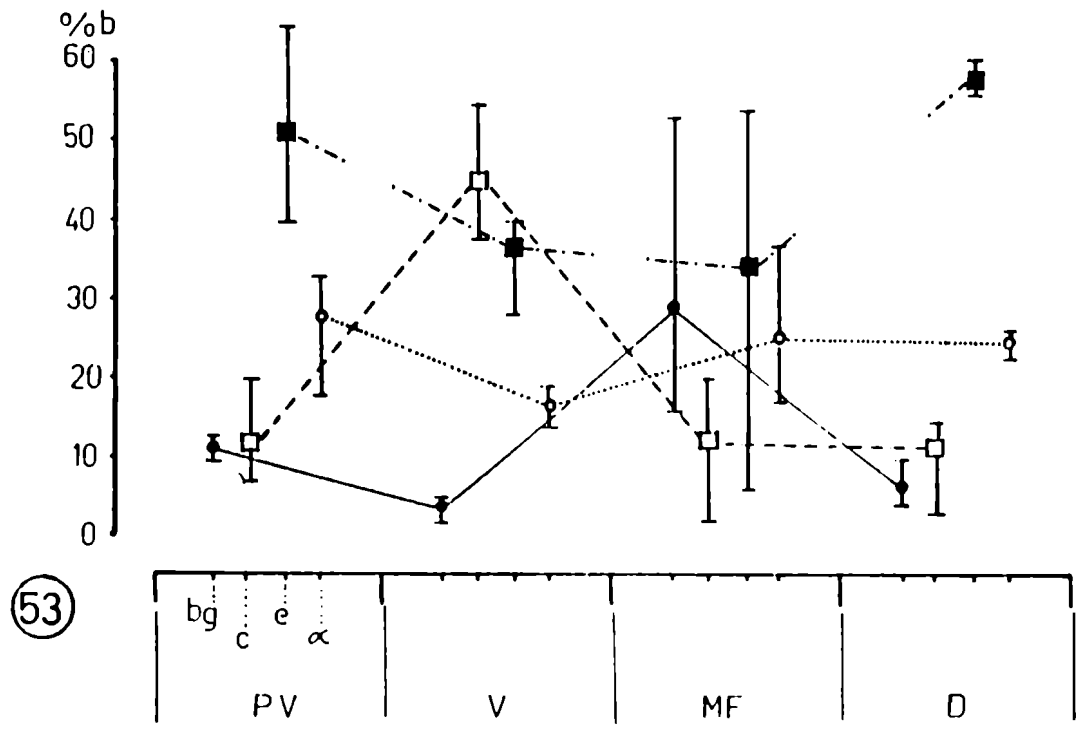
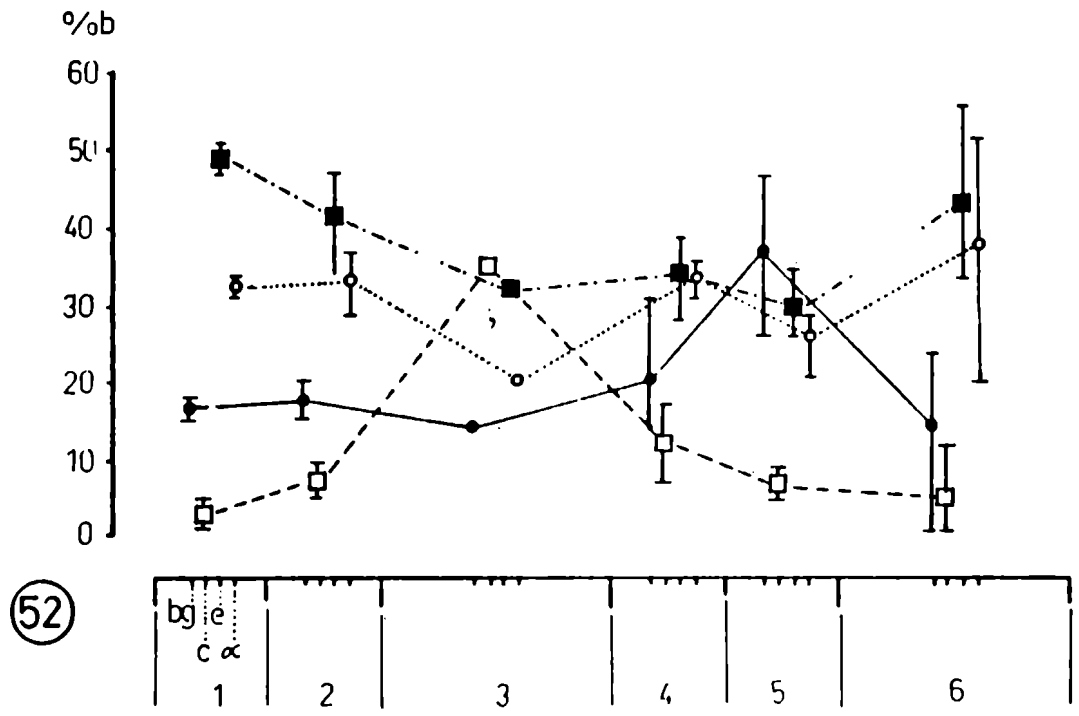


Fig. 52: Machos. Porcentaje de células de la PDP (%b) registrados en los distintos períodos del ciclo anual. Proliferación: inicial (1), final (2); preparación (3); reproducción: inicial (4); plena (5); reparación (6). Fig. 53: Hembras. Porcentaje de células de la PDP (%b) registrados en ejemplares en distinto estado de maduración. Previtelogénesis (PV); Vitelogénesis (V); Maduración final (MF); Desovadas (D). Ref: basófilas granuladas (bg—●); basófilas cisternales (c—□); basófilas escasamente granuladas (e—○); células α (α—○)

ración", pero son escasas en el de "preparación" y en el de "reproducción" (tabla 8, fig. 52).

Hembras:

Las células basófilas totales por unidad de área, muestran diferencias significativas durante el período de vitelogénesis (tabla 9); también estas diferencias serían atribuibles a variaciones de volumen celular. Durante la vitelogénesis las células basófilas cisternales, se presentan en mayor proporción frente a los otros dos tipos de basófilas. Las células basófilas densamente granuladas, son más abundantes durante la maduración final, en cambio las células basófilas escasamente granuladas se encuentran en reducida proporción durante la vitelogénesis y la reproducción, alcanzando valores elevados durante la previtelogénesis y en ejemplares desovados (tabla 9, fig. 53).

No se ha efectuado un análisis mensual de las hembras, debido al carácter asíncrono de H.m.malabaricus que permite encontrar los cuatro tipos de ovarios en una misma muestra mensual.

C.4 DISCUSION

La hipófisis de H.m.malabaricus pertenece al tipo leptobásico, ya que su NH presenta el tallo infundibular bien desarrollado y la AH globular. Con características semejantes a las descritas en otras especies, considerando las distintas poblaciones celulares presentes, posee las tres zonas que habitualmente se reconocen en la AH de

teleósteos (Ball y Baker, 1969; Van Oordt y Peute, 1983).

En H.m.malabaricus, las células basófilas AB +, PAS + de la región ventral de la PDP presentan variaciones relacionadas con el ciclo reproductivo, comparables en ambos sexos, siendo las probables células gonadotrofas. Al respecto, se ha comprobado que el número total de células basófilas presenta diferencias significativas en los períodos "preparatorio" y de "vitelogénesis" (de machos y hembras respectivamente) al igual que lo observado en C.au-ratus (Munkittrick y Leatherland, 1984). Sin embargo, al no haberse observado indicios de división celular, ni de atresia, se debe suponer que ese aumento en el número sería en realidad debido a una disminución del volumen celular que es sesgada por el sistema de recuento. Una explicación similar para esta misma observación se ha dado para Rhamdia hylarifi (Val-Sella y Sasso, 1980) y para R.sapo, si bien en la última no se han encontrado diferencias significativas entre las basófilas totales (Cussac y Maggese, 1987).

Las variaciones observadas en el volumen celular, si bien reflejan una actividad cíclica, no serían las más importantes ya que las principales manifestaciones de esa actividad se encontrarían en los cambios funcionales presentes dentro de las células basófilas. Las células basófilas cisternales, son predominantes en ambos sexos durante el período de "preparación"/"vitelogénesis", caracterizado por la presencia de grandes vesículas, que en Carassius au-ratus han sido indicadas como intervinientes en la síntesis de gonadotrofina (Nagahama y Peter, 1982) al igual que en Rhamdia hylarifi (Val-Sella y Sasso, 1980 a y b). En el pe-

ríodo siguiente ("reproductivo"/"maduración final") en H.m. malabaricus se marca notablemente el incremento de las células basófilas densamente granuladas, observación que se corresponde plenamente a las registradas en otras especies, incluso no emparentadas (Sundararaj, 1959; Sokol, 1961; Schreiberman, 1964; Olivereau, 1967; Ball y Baker, 1969; Marmorino et al, 1969; Viswanathan y Sundararaj, 1974; Van Oordt y Peute, 1983; Munkittrich y Leatherland, 1984; Farbridge et al, 1985). Se observa además que el incremento en la granulación posee correlación con el aumento del índice gonadosomático (IGS) de las hembras en Heteropneustes fossilis (Viswanathan y Sundararaj, 1974) y en Rhambdia sapo (Cussac y Maggese, 1987). Existe correspondencia entre estas observaciones y los niveles de Gth plasmáticos, que en C.commerstoni y C. auratus son reducidos durante la "preparación"/"vitelogénesis" y se incrementan al inicio de la "reproducción" y la "maduración final", evidenciando luego de la freza, una disminución en ambos sexos (Stacey et al, 1984; Kobayashi et al, 1985). La disminución en los niveles de Gth se encontraría en correspondencia con la presencia de células basófilas degranuladas o escasamente granuladas, comunmente observadas (Van Oordt y Peute, 1983).

En H.m.malabaricus las características estructurales y funcionales de la hipófisis parecen ser semejantes en ambos sexos (tablas 8 y 9) no detectándose diferencias significativas en los distintos elementos celulares. En Xiphophorus maculatus, salvo diferencias en el tamaño, tampoco se ha encontrado dimorfismo sexual en la hipófisis

(Schreibman, 1964). En el hermafrodita sincrónico Serranus
scriba los ciclos hipofisario y gonadal respectivamente,
se corresponden (Marmorino et al, 1969).

D. FACTORES AMBIENTALES Y REGULACION DE LA REPRODUCCION

D.1 INTRODUCCION

El ambiente actúa sobre la gametogénesis, la freza y la regresión gonadal aunque los factores que regulan cada una de estas fases suelen ser diferentes y varían entre las distintas especies. En general el fotoperíodo y la temperatura actúan sobre la gametogénesis en las especies subtropicales y de aguas templado-frías en tanto que las especies tropicales se reproducen durante las máximas precipitaciones. La importancia relativa de esos factores depende del sexo, la estación reproductiva y fundamentalmente de las especies. Fotoperíodos largos en combinación con temperaturas cálidas son los que actúan comunmente (Sundararaj y Vasal, 1976; Lam, 1983) si bien el fotoperíodo solo, en su fase creciente, estimula la vitelogénesis en Phoxinus phoxinus (Scott, 1979); especies que desovan en otoño-invierno requieren fotoperíodos decrecientes y temperaturas bajas como estímulo (Ej.: Salmonidos, Billard et al, 1981 b). Sumado a estos estímulos existen evidencias de un control circadiano en varias especies (Iwamatsu, 1978; Lam, 1983).

El control ambiental sobre la freza estaría dado por un requerimiento de temperaturas mínimas o bien por variaciones súbitas, aunque también son fundamentales la presencia de un sustrato apropiado para anidar y los factores sociales en combinación con ritmos circadianos propios de las especies (Lowe-Mc Connell, 1975; Lam 1983).

La regresión de las gónadas parece seguir

un ritmo endógeno más que a los factores ambientales; luego de la freza las gónadas entrarían en un "período refractario" (Yoshioka, 1966; Guraya et al, 1976) relacionado con la supresión del ciclo diario de liberación de gonadotrofina (Peter, 1981). En algunas especies la temperatura, el fotoperíodo, la disponibilidad de alimento, salinidad del agua, estrés y otros disturbios como la polución influyen sobre la regresión (Lam, 1983).

Se han efectuado estudios en varias especies sobre las relaciones entre los factores ambientales y el ciclo de las células hipofisarias comprobando la existencia de una regulación (Viswanathan y Sundaraj, 1974; Iwamatsu, 1978).

En este capítulo se comparan los ciclos ováricos, testiculares e hipofisarios con las variaciones registradas de temperatura, fotoperíodo y las precipitaciones.

D.2 MATERIAL Y METODOS

Los valores extremos y promedios de temperatura y precipitaciones de los años 1983-1988 en conjunto con las medias históricas (1913-1937 y 1937-1967) y el fotoperíodo del año 1985 (datos del Servicio Meteorológico Nacional, Fuerza Aérea Argentina) fueron comparados gráficamente con los ciclos ovárico, testicular e hipofisario. Para ese fin se utilizarón el IGS y la fracción de área correspondiente a los distintos estadios de la ovogénesis (datos del capítulo de ovogénesis) así como el área ocupada por los distintos elementos de la espermatogénesis (capítulo de es-

permatogénesis) y el número de células basófilas granuladas de la PDP hipofisaria (capítulo de hipófisis como órgano regulador).

D.3 RESULTADOS

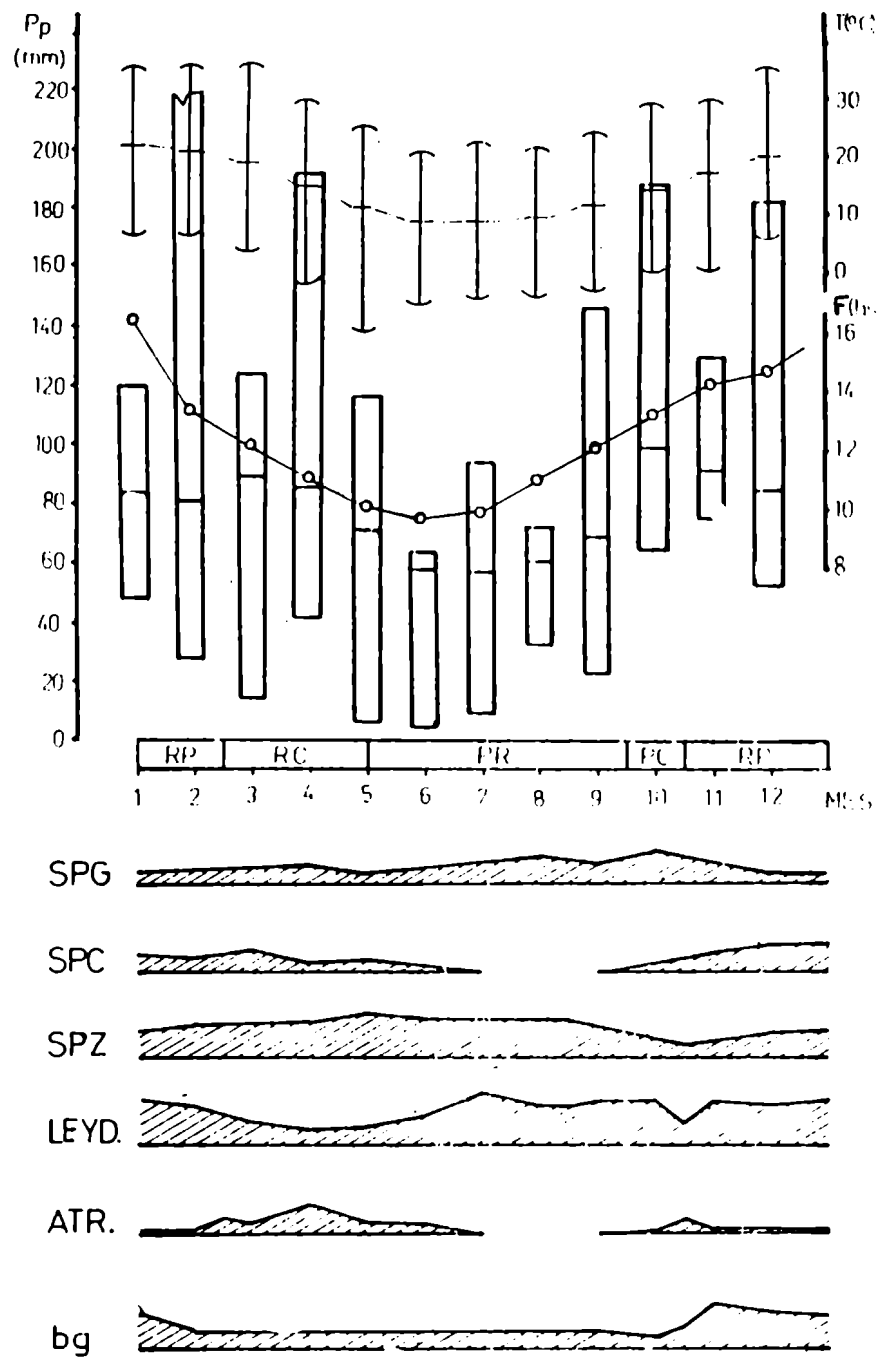
Machos: (fig. 54)

- El período reproductivo se inicia con un fotoperíodo de 14 hs luz en noviembre con tendencia creciente, extendiéndose luego de un máximo de 16 hs de luz hasta aproximadamente 13 hs luz en febrero. La temperatura, creciente, permanece mayor de 17° C. Las precipitaciones son mayores de 80 mm. Las células basófilas granuladas se encuentran en sus cantidades máximas.

- El período de reparación, con fotoperíodo y temperatura decrecientes, se extiende entre 13-10 hs de luz y 19-11° C continuándose la atresia hasta que esos parámetros alcanzan los valores mínimos (hasta julio). Las precipitaciones son superiores o cercanas a 80 mm. Las células basófilas granuladas se encuentran en su nivel basal.

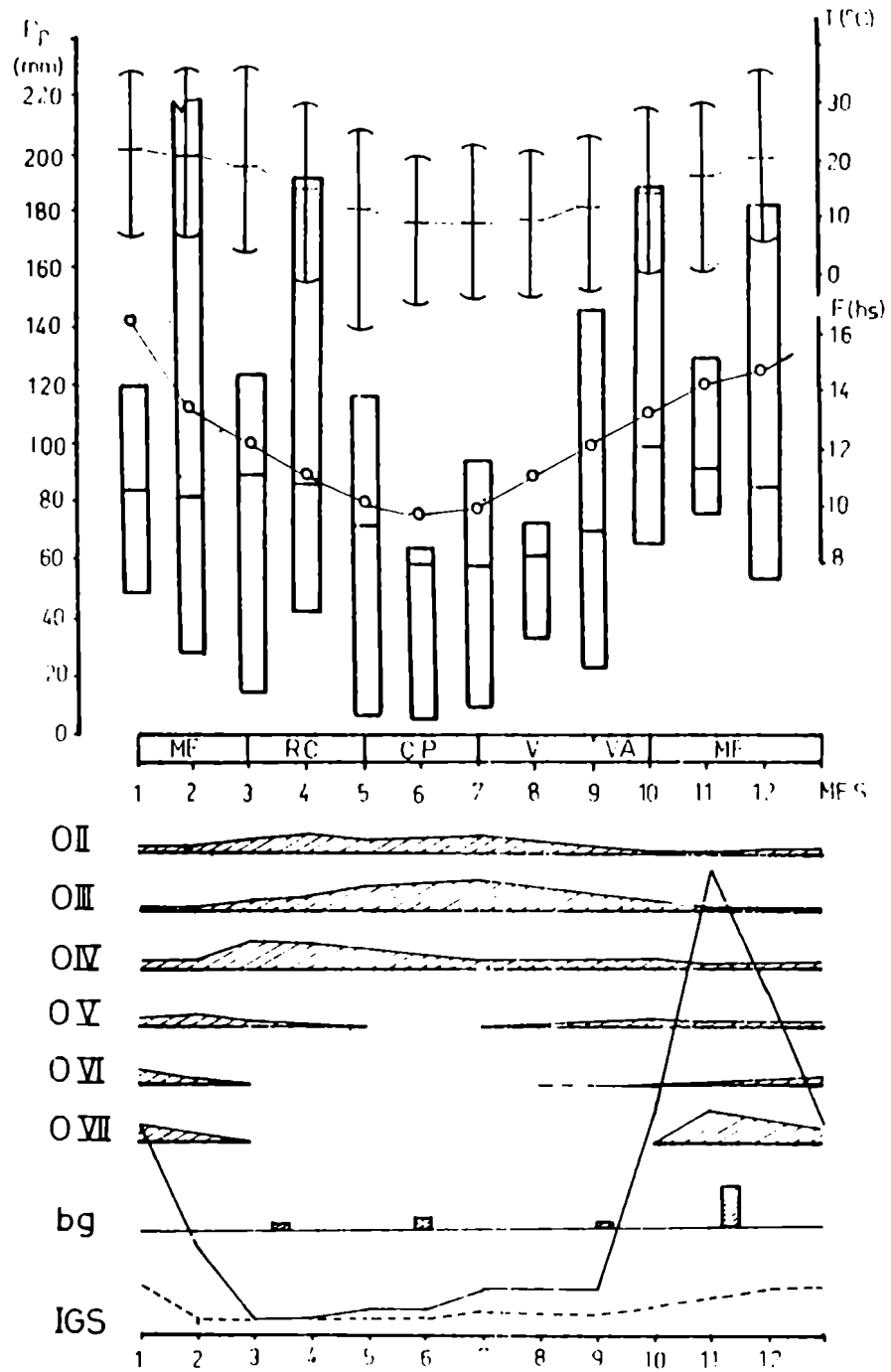
- El período de proliferación se desarrolla con temperaturas y fotoperíodo descendentes hasta el mínimo y luego en ascenso. Las precipitaciones son escasas (menores de 60 mm). Células basófilas granuladas en el nivel basal.

- El período de preparación se observa con temperaturas ascendentes (mayores de 13° C y fotoperíodos de 13 hs de luz) dentro del período de precipitaciones mayores de 80 mm. Células basófilas granuladas en su nivel basal y luego comienzan a incrementarse.



(54)

Fig. 54: Machos. Precipitaciones, media y extremos, (Pp \square), Temperaturas medias y extremas (T \leftrightarrow) y Fotoperíodo (F \circ - \circ), promedios de los registros mensuales 1983-88. Escala relativa de los distintos elementos de la espermatogénesis y de las células basófilas de la FDP. Ref; Reproducción (RP); Reparación (RC); Proliferación (PR); Preparación (PC); Leydig (LEYD); Atrésias (ATR); células basófilas granuladas (bg).



(55)

Fig. 55: Hembras: Precipitaciones medias y extremas (Pp \square), Temperaturas medias y extremas (T \pm \rightarrow) y Fotoperíodo (F \circ \rightarrow) promedios de los registros mensuales 1983-88. Escala relativa de los distintos elementos de la ovogénesis y de las células basófilas de la FDP e IGS. Maduración final (MF); Reparación (RC); Crecimiento primario y formación de los alvéolos corticales (CP); vitelogénesis (V); vitelogénesis activa (VA); células basófilas granuladas (bg).

Hembras: (fig. 55)

- El período de maduración final se inicia con fotoperíodo creciente, cercano a las 14 hs y temperatura también creciente, superior a 17º C. Superado el máximo se extiende hasta un fotoperíodo, decreciente de cerca de 13 hs de luz y temperaturas de 19º C. Las precipitaciones son mayores a 80 mm. Las células basófilas granuladas se encuentran en su máximo.

- El período de reparación se extiende durante el fotoperíodo y las temperaturas decrecientes con células basófilas granuladas escasas. Las precipitaciones otoñales son superiores o cercanas a 80 mm.

- El período de crecimiento primario y formación de **alveolos** corticales se inicia con fotoperíodo y temperaturas decrecientes y continúa con la fase creciente. Las células basófilas granuladas se encuentran en escasa proporción pero no en su mínimo. Las precipitaciones son cercanas a los 60 mm.

- El período de vitelogénesis se inicia cuando el fotoperíodo y la temperatura comienzan a crecer, haciéndose más activo con temperaturas de 12º C y fotoperíodo de 12 hs de luz en conjunto con el inicio de las lluvias primaverales. Las células basófilas granuladas se encuentran en cantidad escasa.

D.4 DISCUSION

En H.m.malabaricus los ciclos reproductivos de ambos sexos presentan coincidencia en sus períodos de "re-

producción"/"maduración final" y de "reparación" si bien hay que destacar que la variedad de estados de maduración de las hembras hace que no toda la población se encuentre en fase. Los períodos de "proliferación" y de "preparación" de los machos y de "crecimiento primario" y "vitelogénesis" de las hembras no son homólogos y la única relación temporal es su desarrollo dentro de los meses de mayo-octubre.

H.m.malabaricus comienza a reproducirse con fotoperíodos de 14 hs de luz y 10 hs de oscuridad, temperaturas ambientales medias mensuales superiores a 17º C (con máximas cercanas a los 30º C y mínimas próximas a 0º C) y durante el período de las lluvias mayores de 80 mm, primaverales-estivales.

En ambos sexos, globalmente, las condiciones de temperatura, fotoperíodo y precipitaciones son las mismas durante el período reproductivo, sin embargo existen una importante diferencia entre los sexos. Los machos, en forma más homogénea se relacionan con los factores ambientales, en cambio las hembras, a causa de su variabilidad, si bien se encuentran dentro del período favorable para reproducción, parecen responder a otros estímulos para marse a los ejemplares en estado reproductivo. Diferencias sexuales de este tipo son comunes entre los teleosteos (de Vlaming 1972 a y b; Lam, 1983).

El período reproductivo se relaciona también con las máximas cantidades de células basófilas densamente granuladas de la hipófisis. Estas se observan en la población de machos adultos y solo en las hembras que se

encuentran en la fase de maduración final reflejando que los factores ambientales homogéneos para todos los ejemplares influirían sobre la hipófisis de los machos, pero que las hembras responderían a otros estímulos pues gran parte de éstas no se encuentran en maduración final.

Las células de Leydig testiculares presentan dos fases, una no relacionada con el incremento de las células gonadotróficas y una segunda relacionada con ese aumento durante el período reproductivo. Las células ováricas de la granulosa presentan un cambio morfológico manifiesto en el transcurso de la fase de maduración final.

La actividad reproductiva, comunmente es estimulada por la temperatura y fotoperíodo en combinación (Viswanathan y Sundararaj, 1974; Sundararaj y Vasal, 1976; Lam, 1983). En H.m.malabaricus la formación de SPC 1 se inicia con temperaturas y fotoperíodos altos en forma semejante a lo observado en Phoxinus laevis (Bullough, 1939) a la vez que, en la misma especie el fotoperíodo creciente estimula la vitelogénesis (Scott, 1979). En cambio, en varias especies y contrariamente a lo observado en H.m.malabaricus y en Couessius plumbeus la etapa de espermiación es la menos dependiente del ambiente (Ahsan, 1966).

El período de "reparación" se relaciona en H.m.malabaricus con fotoperíodo y temperaturas decrecientes y en apariencia es independiente de las fuertes precipitaciones otoñales. Se observa también que los niveles de células gonadotrofas son bajos; en conjunto, las células de Leydig decrecen y las atresias se incrementan en los machos.

Los periodos de "proliferación" y el de "crecimiento primario" no son homólogos a pesar de desarrollarse en las mismas condiciones ambientales y con niveles bajos de células gonadotróficas. En los machos el periodo de "proliferación" se desarrolla conjuntamente con un incremento de las células de Leydig.

La "preparación" testicular y la "vitelogenesis" activa se desarrollan con fotoperíodos y temperaturas crecientes y precipitaciones copiosas evidenciando diferencias entre los sexos al igual que durante la etapa reproductiva.

III. ENSAYOS SOBRE LA INDUCCION DE LA MADURACION FINAL, LA OVULACION Y LA ESPERMIACION

III.1 INTRODUCCION

Los peces, en general, ofrecen un número de ventajas sobre los Mamíferos en lo referente al desarrollo de la reproducción controlada y a otras biotecnologías asociadas (Wilkins, 1981). Alta fecundidad, fertilización externa, labilidad de la diferenciación sexual a la intervención hormonal, sobrevivencia de híbridos interespecíficos y la factibilidad de una manipulación cromosómica constituyen, hasta el momento, indudables ventajas (Donaldson, 1986).

Estudios sobre el control de la reproducción, conducidos en algunas especies, comprueban características comunes así como diferencias de intrínseco valor biológico (Hoar et al, 1983). Si bien estos mecanismos no están completamente dilucidados, se han establecido las líneas generales:

La reproducción, influida por los factores ambientales, es regulada por medio del sistema nervioso central; el hipotálamo produce un decapeptido liberador de la gonadotropina (GnRH) que actúa sobre la hipófisis (Peter, 1983; de Leeuw, 1985). Las gonadotropinas (Gth), transportadas por vía circulatoria, actuarían sobre la síntesis de mediadores esteroideos (sustancias inductoras de la maduración o "MIS") en el ovario, como es el caso de la generalidad de los teleósteos. (Jalabert, 1976; Goetz, 1983) o bien en el tejido interrenal, como en el caso de Heteropneustes fossilis (Sundararaj,y

Goswami, 1977; Sundararaj et al, 1979).

Los mecanismos de acción de distintas hormonas fueron estudiados in vitro, confirmando el papel de las gonadotrofinas en numerosas especies (ver tabla II, Goetz, 1983), probando como más efectivas a las Gth homólogas frente a las heterólogas. Estas diferencias se han relacionado con variaciones en la estructura de la Gth que les otorgarían especificidad (Bonna Gallo y Licht, 1983; Goetz, 1983).

La gonadotrofina actuaría sobre el folículo (fig. 56) (Jalabert, 1976) produciendo esteroides activos en la maduración en las células de la granulosa (Iwamatsu, 1980). Estas observaciones fueron confirmadas por medio de estudios con inhibidores de las enzimas esteroideogénicas (Jalabert, 1976; Young et al, 1982) .

Las células de la granulosa producen esteroides del grupo de los progestágenos entre los que fueron identificadas la progesterona, 17α Hidroxiprogesterona, 17α 20β di OH progesterona (17α 20β DHP) (Schmidt e Idler, 1962). Su producción fue comprobada por incubación con precursores marcados (Goetz y Bergman, 1978; Theofan y Goetz, 1983), confirmando también que la Gth induce un incremento en los niveles de 17α 20β DHP (Suzuki et al, 1981; Fostier et al, 1981). Esta última hormona es producida en altas cantidades antes de la maduración final ovocitaria (Young et al, 1983; Dye et al, 1986; Van der Kraak y Donaldson, 1986) y durante las últimas fases de la espermatogénesis, previo a la espermiación (Dye et al, 1986), siendo indicada como el "Mis" que actuaría directamente sobre la maduración final del ovoci-

to (Detlaff y Skoblina, 1969; Jalabert, 1976; Goetz, 1983).

Existiría un mecanismo de facilitación (fig. 56), también regulado por la hipófisis, que estaría mediado por ACTH, la que actuaría sobre la interrenal y/o sobre el ovario produciendo corticosteroides (Schmidt e Idler, 1962); Jalabert, 1976; Colombo et al, 1973, 1978; Tessone y Charreau, 1980; Theofan y Goetz, 1983). Entre estos, los desoxicorticosteroides, actuarían elevando la concentración de 17α 20β DHP libre por desplazarlos del equilibrio en que se encuentran ligados a proteínas transportadoras (transcortinas) en el plasma sanguíneo (Fostier y Breton, 1975; Jalabert, 1976; Goetz, 1983).

Otros esteroides, como los andrógenos y estrógenos tendrían un efecto indirecto en la regulación de la maduración final, ejerciendo retroalimentación a varios niveles (Jalabert, 1975; Theofan, 1981; Sundararaj et al, 1978; Fostier et al, 1978).

El mecanismo de la ovulación es menos conocido. Si bien suelen registrarse niveles elevados de Gth (Dye et al, 1986) así como de esteroides involucrados en la maduración final (Goetz, 1983), no es seguro que sean necesarios para la ovulación. Cabe la posibilidad de una regulación independiente, ya que se la puede disociar experimentalmente de la maduración final (Jalabert, 1976; Berndtson y Goetz, 1986). Algunos autores sugieren una mediación del sistema nervioso autónomo, ya que la epinefrina actuaría sobre receptores α - adrenérgicos (Jalabert, 1976) en relación con la producción de prostaglandinas. En particular la $PGF_{2\alpha}$ actuaría sobre la expulsión del ovocito es-

estimulando la contracción de las células de la teca (Szöllősi y Jalabert, 1974; Nagahama et al, 1976; Yorke y Mc Millan, 1980).

La intervención exógena para inducir la maduración final y la ovulación, basada en los mecanismos de regulación expuestos, utiliza gran variedad de compuestos con distinto grado de eficacia, a distintos niveles (fig. 57), entre las especies ensayadas (Lam, 1982; Donaldson y Hunter, 1983; Donaldson, 1986).

1) Antiestrógenos: son productos sintéticos que inhiben la retroalimentación negativa que ejercen los estrógenos y andrógenos sobre la liberación de gonadotropinas (Singh y Singh, 1976). Entre estos productos se encuentran el citrato de clomifene, el tamoxifeno y el ciclofenil, siendo exitosos en algunas especies (Pandey y Hoar, 1972) aunque a dosis excesivas pueden actuar en forma inversa (Breton et al, 1982).

2) Antagonistas de la dopamina: la dopamina fue identificada como el posible inhibidor de la GnRH (Chang y Peter, 1982, 1983; Chang et al, 1983). Compuestos antagonistas como el pimozide y el haloperidol liberan esa inhibición (Chang y Peter, 1982, 1983).

3) GnRH y sus análogos superactivos: este decapeptido y algunas variantes de mayor vida media son efectivos en inducir maduración final y ovulación en varias especies (Hirose e Ishida, 1974; Fujino et al, 1974; Goetz, 1983).

4) Gonadotrofinas:

4.a. Extractos y homogenatos de hipófisis: es la técnica más simple y económica aunque posee la desventaja de requerir donantes y que es difícil de estandarizar. Empleada por primera vez por Houssay (1930, 1931), cobró gran popularidad y es aún la más utilizada (Chaudhuri, 1976; Lam, 1982). El procedimiento se basa en la adecuada selección de los donantes, la evaluación de la madurez de los receptores, la dosificación y en establecer el tiempo del efecto de la hormona (Lam, 1982).

4.b. Preparaciones purificadas de Gth: posee algunas ventajas debidas a su pureza: solubilidad, estabilidad y facilidad para estandarizar en ensayos. Han sido aisladas en pocas especies (Burzawa-Gerard, 1971, 1974; Donaldson y Hunter, 1983) existiendo también algunas parcialmente purificadas (Donaldson y Yamazaki, 1968; Donaldson et al, 1972). Si bien son activas en una variedad de especies existe especificidad de especie confirmando que no posee siempre la misma estructura (Kuo et al, 1974; Castagnoli y Donaldson, 1981; Donaldson y Hunter, 1983).

4.c. Gth de Mamíferos: ventajosas por ser accesibles, como productos farmacéuticos, son baratas y estandarizables. Se han comprobado como efectivas en numerosas especies, principalmente la GCH (Lam, 1982).

5) Esteroides:

5.a. Progestágenos: la progesterona y sus derivados actuarían como sustratos para la producción de 17α 20 β DHP (Jalabert et al, 1978). Esta última hormona

es efectiva, en truchas, solo en ovocitos cuya vesícula germinal es subperiférica, es decir próximos a la maduración final (Jalabert et al, 1978). La ovulación en estos casos parece ocurrir solo si la Gth endógena se encuentra en concentraciones suficientes (Lam, 1982); es decir, que los progestágenos pueden reemplazar a la Gth solo parcialmente (Donaldson y Hunter, 1983).

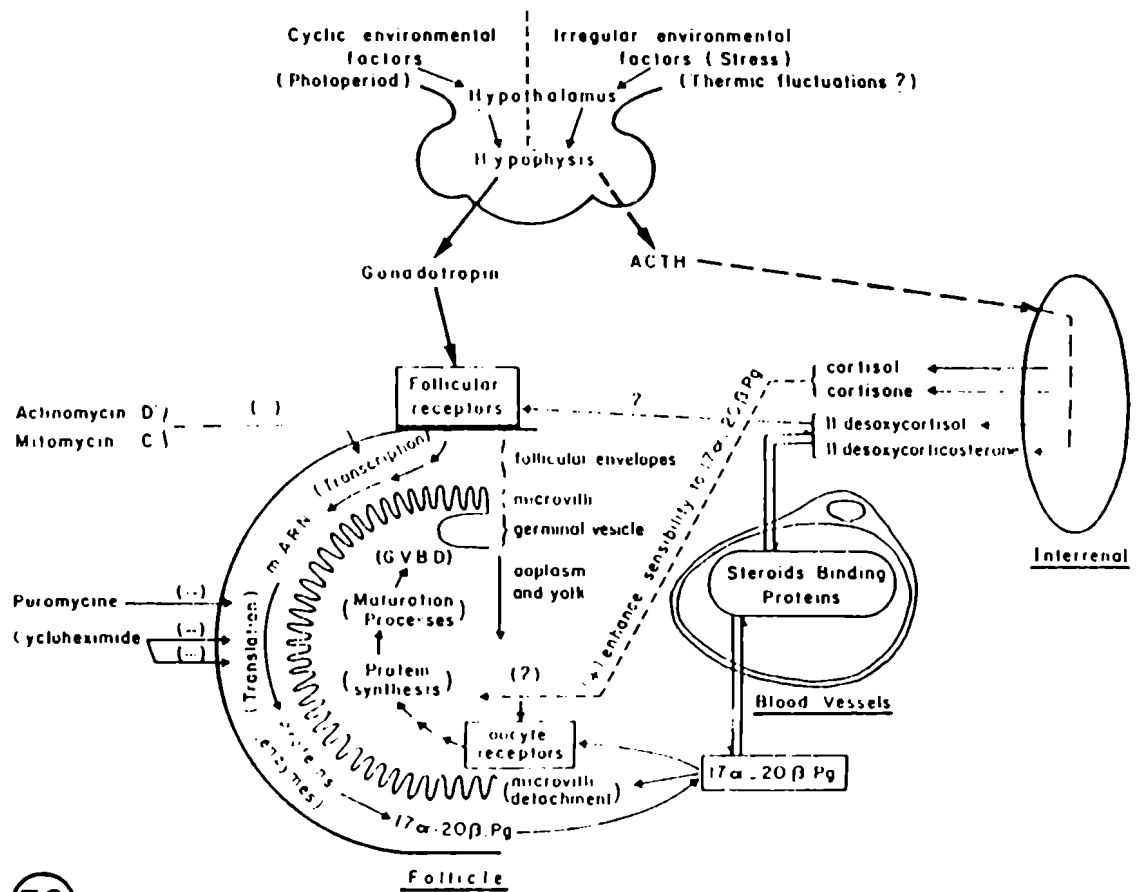
5.b. Corticosteroides: son efectivos en algunas especies donde actúan elevando el nivel de 17α 20β DHP libre (Lam, 1982; Donaldson y Hunter, 1983).

6) Prostaglandinas y catecolaminas: actúan directamente sobre la ovulación (Jalabert, 1976; Singh y Singh, 1976). También la PG F 2α inyectada en el IV ventrículo cerebral induce conducta reproductiva (Stacey y Peter, 1979).

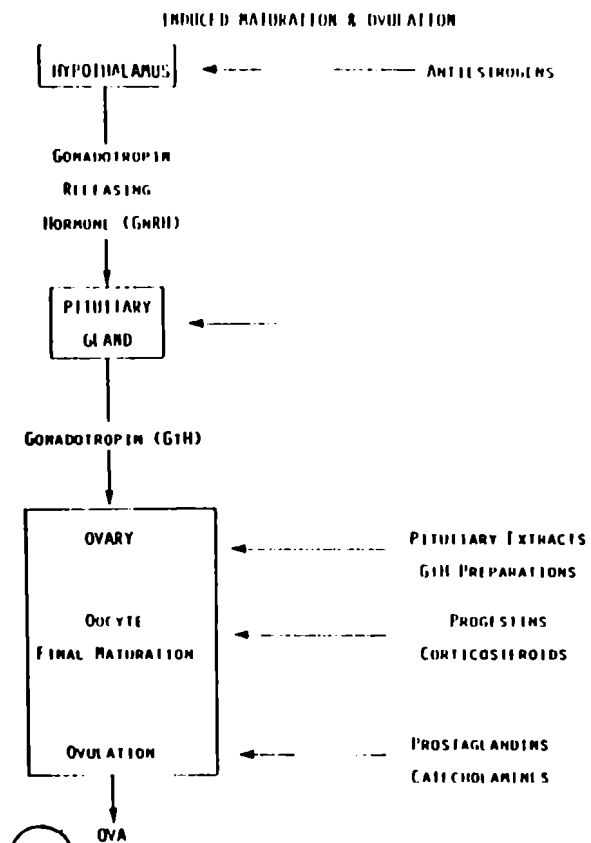
Inducción de la espermiación: suele ser más simple de inducir que la ovulación. En general los machos esperman espontáneamente sin embargo en caso de emitir esperma poco fluido o en los casos de falta de espermiación se utiliza la intervención hormonal:

- GnRH: efectiva en Salmo salar (Weil y Crim, 1982) e inefectiva en Essox lucius (Billard y Marcel, 1980) y en Carassius auratus (Peter, 1980).

- Homogenatos de hipófisis: efectivos en algunas especies (Chaudhuri, 1976; Lam, 1982). Se emplean también purificados de Gth (Donaldson y Hunter, 1983) y GCH (Yamazaki y Donaldson, 1968; Billard, 1976; Donaldson y Hunter, 1983).



56 Tentative scheme for the control of oocyte maturation in trout. GVBD, germinal vesicle break down. (Tomado de Jalabert, 1976).



57 Sites of action of specific endocrine methodologies for the control of maturation and ovulation in salmonids. (Donaldson, 1986).

- Esteroides: Andr6genos (metiltestosterona, 11 ketotestosterona, dehidroepiandrosterona, testosterona) (Yamazaki y Donaldson, 1969; Billard, 1976) reportándose tambi6n efectos adversos con estas mismas hormonas dependiendo de la modalidad de administraci6n (Billard et al, 1981).

Progest6genos (progesterona, 17 α hidroxiprogesterona y 17 α 20 β DHP) (Billard, 1976; Scott y Baynes, 1982).

En Brasil, trabajos de la CNP han probado como efectiva la inducci6n de la ovulaci6n en H.m.malabari-
cus mediante el empleo de macerados de hip6fisis obtenidas de ejemplares en estro (sin aclarar la especie) inyectados en forma gradual. Los resultados positivos se obtuvieron en animales que se encontraban en la fase de anidaci6n es decir con conducta reproductiva, en los ejemplares que no evidenciaban estas caracteristicas los resultados fueron negativos (Azevedo y Gomes, 1942; Godoy, 1975).

El objetivo de este capitulo es comprobar la actividad de distintas hormonas, gonadotrofinas, esteroides y antiestr6genos sobre ejemplares de H.m.malabaricus que no evidencian conducta reproductiva.

Las hormonas se ensayaron in vitro y se corroborar6 su efecto in vivo. Los macerados de hip6fisis hom6loga, por ser el medio m6s econ6mico se analizar6n en forma m6s exhaustiva.

III.2 MATERIAL Y METODOS

Durante el período noviembre-febrero de los años 1986-1988, ejemplares adultos de H.m.malabaricus fueron capturados mediante "cercos" con redes o con espinales. Transportados a la Estación Hidrobiológica de Chasco-mús, se los acondicionó en acuarios de 1000 lts con agua circulante, temperatura de 18-19°C y fotoperíodo de 14 hs de luz - 10 hs de oscuridad, de acuerdo al fotoperíodo largo de la época reproductiva. Durante el período de cautiverio los ejemplares no se alimentaron.

Las heridas y pérdidas de escamas fueron tratadas con el antiséptico Merthiolate solución (Merck) para prevenir micosis siendo de mucha ayuda, también, el agua circulante.

a) Selección de los reproductores:

Los ejemplares fueron anestesiados con benzocaina (100 ppm) hasta la pérdida de los movimientos operculares (5 minutos) que permitió mantener los ejemplares por 20-30' inmóviles fuera del agua y realizar las laparotomías si fueran necesarias, siendo rápida la recuperación al regresarlos al agua (5 minutos). Los ejemplares sedados fueron medidos, pesados y sometidos a un examen para determinar el sexo. Este se efectuó utilizando algunas características que hemos encontrado en la papila urogenital en combinación con canulaciones a través del orificio urogenital con una sonda plástica de Ø 25 mm.

Los ovocitos obtenidos durante la canulación intraovárica por biopsia fueron medidos bajo lupa, de-

terminando su diámetro. Las muestras que presentaban ovocitos en vitelocénesis fueron tratadas con solución "clarificadora" (ácido acético 6%, glicerina 4%, sol. fisiológica 90%) para observar la posición de la vesícula germinal de los mismos. Ejemplares con evidencias de no haber completado la vitelogénesis, es decir, diámetro del ovocito menor de 1,3 mm (estadio VI o anteriores) ó con ovarios recientemente desovados con ovocitos en atresia, fueron descartados, seleccionando ejemplares con ovocitos en estadio VII. Ejemplares dudosos fueron sometidos a una laparotomía exploratoria para visualizar la gónada.

Los machos no emitían semen al estímulo de presión abdominal; no siendo posible efectuar una selección previa al tratamiento, se optó por tener un testigo de control histológico. Para ello, los machos fueron biopsiados durante las laparotomías obteniendo una muestra del estado inicial de la gónada (M0). Luego de suturar músculo y piel por separado se trató la zona con antibióticos (sulfas y gentamicina). Los ejemplares fueron inyectados con la primera dosis y vuelta al agua para su rehabilitación. El tratamiento hormonal subsiguiente se efectuó sin el uso de anestesia.

b) Acción hormonal en los machos

Con el fin de verificar la acción hormonal sobre la espermatogénesis, espermiogénesis y espermiación, se trataron los ejemplares con distintas hormonas. Cada muestra (M_1, M_2, \dots, M_n) obtenida por duplicado significa un par de ejemplares que fueron sacrificados fijando el tes-

tículo contralateral al biopsiado en Bouin para su proceso histológico.

Los ensayos hormonales se efectuaron según los siguientes esquemas:

a) Macerados totales de hipófisis homóloga (HH) en solución fisiológica (0,9% ClNa). Inyección intraperitoneal.

Biopsia

6hs							(Esquema 1)
MO			M1	M2	M3	M4	Muestra/tiempo
0,05	0,75	1	3	4,5	6		H/kg por dosis
0	0,5	1,25	2,25	5,25	9,75	15,75	Total efectivo (H/kg)
0	6	12	18	24	30	36	Tiempo acumulado (hs)

b) Gonadotropina coriónica humana (GCH) (Endocorion, Elea) disuelta en solución fisiológica. Inyección intraperitoneal.

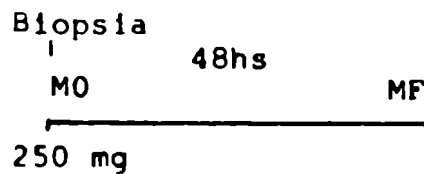
Biopsia

6hs							
MO		M1	M2	M3	M4	M5	Muestra/tiempo
100	300	450	600	750			UI/kg por dosis
0	100	400	850	1450	2200	2200	Total efectivo (UI/kg)
0	6	12	18	24	30	36	Tiempo acumulado (hs)

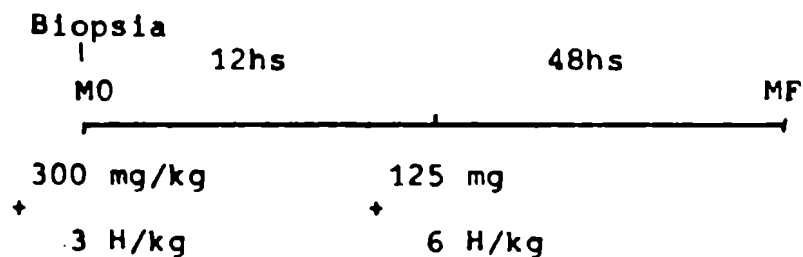
c) Metiltestosterona (MT) (Russell) disuelta en alcohol propilenglicol (1:1) y suspendida en solución fisiológica (Max 10%). Inyección intraperitoneal.

Biopsia							
	6hs	6hs	6hs	6hs	6hs	6hs	
MO				M1	M2	M3	M4 Muestra/tiempo
50	150	250					mg/kg por dosis
0	50	200	450	450	450	450	Total efectivo (mg/kg)
0	6	12	18	24	30	36	Tiempo acumulado (hs)

d) Testosterona (T) (Testoviron depot, Schering) vehiculo: aceite de girasol, inyección intraperitoneal.



e) Testosterona + Hipófisis homóloga (T + H):



Los controles se efectuaron sobre animales biopsiados por laparotomía e inyectados periódicamente con solución fisiológica, procediendo luego de 42 hs al muestreo de la gónada contralateral.

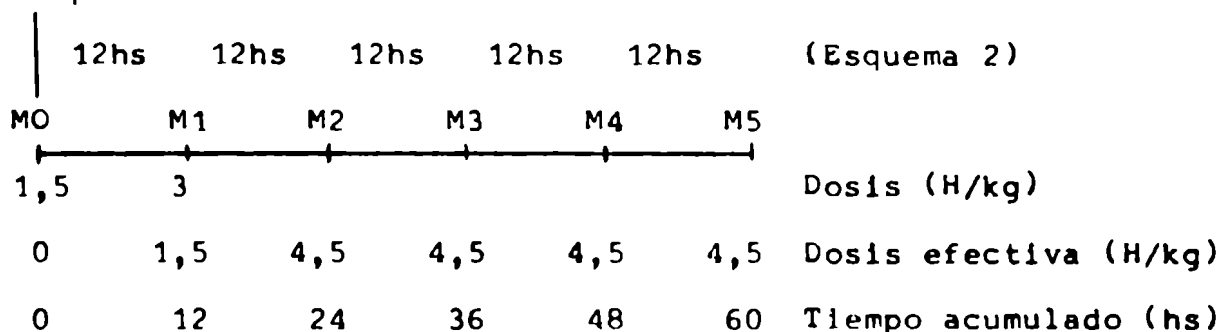
Las muestras fueron examinadas utilizando el sistema Kontron MOP 3 Zeiss (CONEA) para el recuento de las áreas ocupadas por cada uno de los elementos celulares, el número de células de Leydig y una medida de la densidad de SPZ, en forma idéntica al capítulo de espermatogénesis. Los resultados se expresaron en μm^2 y porcentajes relativos

a un total de 89.000 μm^2 contadas.

El control estadístico se realizó mediante un Anova y comparaciones de Tuckey entre las distintas muestras tomadas (M1, 2, ..., MF) y los controles con solución fisiológica utilizando en cada caso las diferencias entre la muestra inicial (MO) y la respectiva luego de cada tratamiento (Mk para k= 1, 2, ..., MF), realizando también un análisis de regresión para cada tratamiento (Sokal y Rohlf, 1969). Los mismos fueron analizados utilizando el test no paramétrico de los signos para muestras pareadas (s) por medio del cual se compara cada muestra final con su propia muestra inicial (Siegel, 1979).

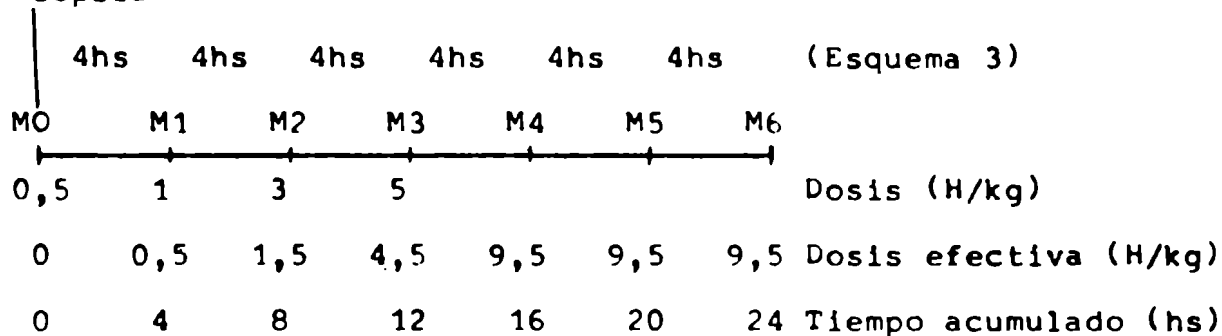
El ensayo de inducción con hipófisis fue repetido controlando la emisión de semen por masajes abdominales suaves, en lugar del muestreo histológico. Un segundo esquema más reducido fue ensayado:

Biopsia



así como un tercero:

Biopsia



El grado de **repleción** de los lóbulos espermáticos, de los ductos eferentes y del ducto deferente fue registrado por medio de una escala objetiva: 0= 0 a 25% de la superficie ocupada por SPZ, 1= 25-50%, 2= 50-75%, 3= 75-100%.

Con el objeto de verificar diferencias de peso testicular debidas a la acción hormonal hipofisaria, dos lotes de ejemplares, con pesos equivalente, fueron inyectados respectivamente con solución fisiológica (como control) y con macerados de hipófisis (0,5; 1; 3 y 5 H/kg cada 4 hs). 24 horas después de la primera dosis se los sacrificó, extrayendo los testículos con sumo cuidado y determinando el peso fresco (W_f) al miligramo. Se desecaron los testículos durante 24 hs a 60° C y se los volvió a pesar (W_s). La diferencia se ponderó respecto del peso testicular: $H = \frac{W_f - W_s}{W_f} \cdot 100$. Los resultados se verificaron mediante un anova de una vía (Sokal y Rohlf, 1969) y por la prueba no paramétrica de la mediana de Wood Wertenberg para muestras independientes.

Un ensayo, efectuado para controlar la existencia de espermiación, se llevó a cabo sobre dos lotes de animales. Ambos fueron laparotomizados y se procedió a ligar el testículo izquierdo en su porción más caudal, dejando libre el derecho. Un lote fue inducido con hipófisis homóloga (0,5; 1; 3 y 5 H/kg cada 4 hs) y el control fue inyectado con solución fisiológica 0,9%. Los ejemplares fueron sacrificados 24, 36 y 48 hs después de la primera inyección y los testículos procesados para su examen histo-

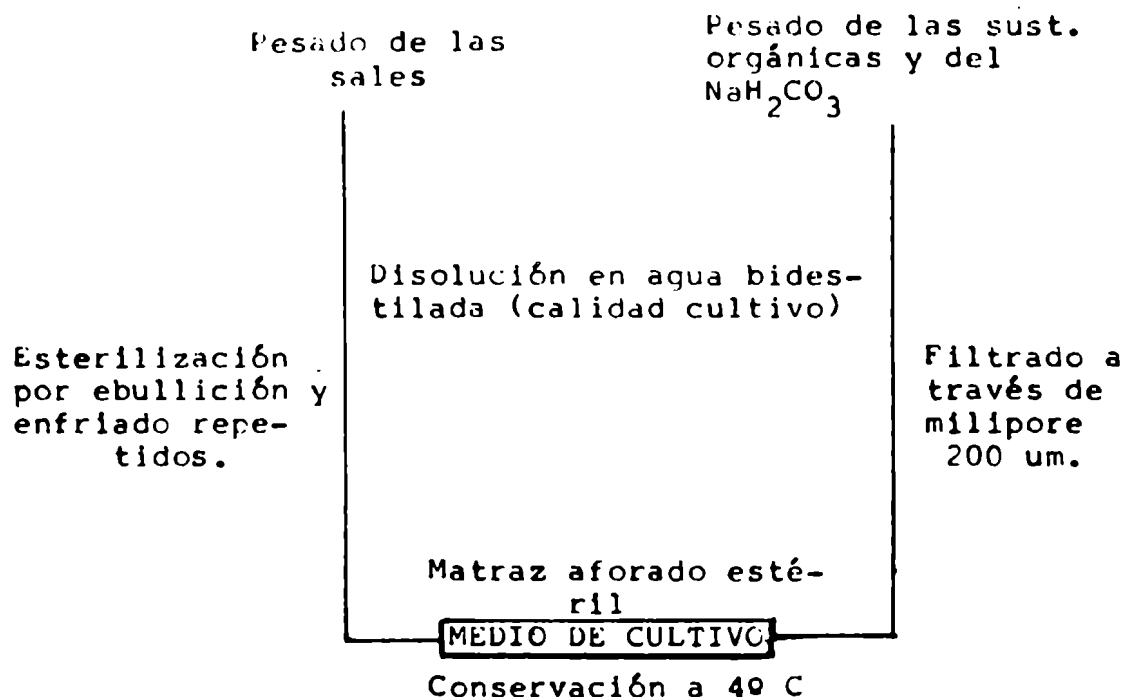
lógico.

c) Envejecimiento de los SPZ:

Se han efectuado controles de motilidad y viabilidad con espermatozoides en diversas condiciones: de ejemplares sin tratar recién sacrificados, de ejemplares inducidos almacenados en refrigeración ($\approx 5^{\circ}\text{C}$) por 24 hs y por 48 hs. Los testículos en todos los casos fueron extraídos, trozados y macerados empleándolos para los controles de motilidad y para los controles de viabilidad. Esta última se verificó fertilizando lotes de 200-300 ovocitos de una misma hembra con los distintos testículos a ensayar, producida la eclosión se recontó el número de muertos, malformados y normales en cada tratamiento.

d) Cultivo in vitro de tejido ovárico:

Hembras con ovocitos VII fueron preparadas para la extracción de las gónadas cuidando las condiciones de esterilidad por medio de lavajes sucesivos de la piel con hipoclorito de sodio y alcohol 70% recién preparado (Wolf y Quimby, 1969). Los ovarios fueron retirados con instrumental esterilizado y en proximidad de la llama de un mechero. Las gónadas se lavaron en dos baños sucesivos de medio de cultivo y luego se procedió a fragmentarlas con la ayuda de tijeras para iris y pinzas de punta fina. Los fragmentos se colocaron en cubetas de fondo plano (3,5 ml, LINBRO) a razón de 30 folículos ($0,1 \text{ cm}^3$) en 0,3 ml de medio. Preparación de los medios: los distintos medios se prepararon según el siguiente esquema:



Para la selección del medio adecuado se prepararon las cuatro fórmulas de uso más común (tabla 10).

Los cuatro medios fueron ensayados por triplicado sobre dos hembras y examinados a las 24, 48 y 72 hs.

El examen consistió en: 1) verificar cambios del pH a través del indicador Rojo de Fenol (Amarillo: 6,8-7,4: Rojo) y de pHmetro. 2) Observación de la estructura del tejido ovárico a través del microscopio estereoscópico, utilizando material fresco y también transparentado con solución "clarificadora" (Glicerina 4%, Acido acético 6%, Sol. fisiológica -0,9% NaCl- 90%). 3) Tinción in toto del tejido ovárico con colorantes vitales: 2 minutos en eosina azulada 0,5% en Holtfreter o 2 minutos en eosina azulada 0,8% + Fast Green 2% en Holtfreter, procediendo luego a lavarlo con solución fisiológica (0,9% NaCl) y a observarlo en la misma solución. Se tiñen las células que se encontrarían dañadas (Aalseth y Saacke, 1986).

	EARLE	CORTLAND	TBSS	CBSS
NaCl	6,8	7,25	8,6	7,3
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,27	0,23	0,5	0,35
KCl	0,4	0,38	0,23	0,18
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0,14	0,41	0,12	0,08
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0	0	0,2	0,18
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	0,23	0,07	0,07
NaHCO ₃	2,20	1,0	0,57	0,98
Glucosa	1,0	1,0	1,0	1,0
Rojo de Fenol	0,02	0,02	0,02	0,02
Penicilina	10 ⁵ UI	10 ⁵ UI	10 ⁵ UI	10 ⁵ UI
Estreptomina	0,1	0,1	0,1	0,1
Nystatina	25.000UI	25.000UI	25.000UI	25.000UI
Presion osmotica (mMol/Kg)			310	275
Pto. congelación(°C)	-0,58	-0,58		
pH			7,3-7,5	7,3-7,6

Tabla 10: Composición de los medios de cultivo empleados. (en Gramos/litro).

Ajuste de la presión osmótica del medio de cultivo: de varios ejemplares de Hoplias se extrajo 1 ml de sangre de la vena caudal utilizando 0,1 ml de EDTA como anticoagulante, se centrifugó 5 minutos a 4000 RPM extrayéndose el suero. Se determinó la presión osmótica de las muestras y de la fracción correspondiente al EDTA, por medio de un osmómetro de presión de vapor, calculándose la osmolaridad del suero. Luego se determinó la presión osmótica del TBSS preparado ajustándola empíricamente con la adición de NaCl, la nueva solución se denomina TBSSh.

e) Acción hormonal in vitro:

Sobre fragmentos de tejido ovárico de dos hembras obtenidos según consta en el punto: Cultivo in vitro de tejido ovárico, se ensayaron:

A. Macerados de hipófisis homóloga en medio de cultivo TBSSh, se utilizó el sobrenadante que queda luego de 6 á 12 hs de extracción. Las concentraciones fueron preparadas en base al peso seco de las hipófisis utilizadas. Los ensayos se efectuaron usando 0,0018 á 18 mg de hipófisis/ml. Un ensayo fue efectuado con extracto alcohólico de hipófisis según la técnica de Otsuka (1956, en: Donaldson et al, 1972).

B. Gonadotropina coriónica humana (GCH) (Endocorion, ELEA), disuelta en medio de cultivo (TBSSh) en concentraciones de 0,1 á 1000 UI/ml.

C. Progesterona (Prog.) (RUSSELL) disuelta en alcohol etílico 100% - Propilenglicol (1:1) máximo 20% en TBSSh. Ensayada en concentraciones

de 0,01 á 100 $\mu\text{g/ml}$.

D. $17\alpha 20\beta$ Dihidroxi-4-pregnen-3-ona ($17\alpha 20\beta$ DHP, SIGMA) disuelta en alcohol etílico 100%, máximo 20% en TBSSh. Ensayada en concentraciones de 0,01 á 100 $\mu\text{g/ml}$.

E. 11 Desoxicorticosterona (DOC, SIGMA) disuelta en alcohol etílico 100%, máximo 20% en TBSSh. Ensayada en concentraciones de 0,01 á 100 $\mu\text{g/ml}$.

Los controles se efectuaron en TBSSh solo o adicionado con los solventes utilizados para los esteroides.

Las replicaciones de los ensayos fueron examinadas a las 24, 48 y 72 hs, incubando a 25-27°C. Se registró en cada caso la posición de la vesícula germinal, calculando el porcentaje de ovocitos que alcanzaron la maduración final y el porcentaje de deteriorados. Para el análisis estadístico de los resultados se transformaron los porcentajes por medio de la función $\text{Arsen}\sqrt{P}$, analizándolos luego con un ANCOVA y contrastes entre las concentraciones (Sokal y Rohlf, 1969).

f) Acción hormonal in vivo:

Se suministraron las siguientes hormonas:

A. Hipófisis homóloga: las hipófisis de H.m.malabaricus utilizadas en los ensayos de inducción, fueron extraídas durante la temporada reproductiva de ejemplares provenientes de la pesca comercial y desecadas en acetona fría (Donaldson y Hunter, 1983). El suministro se efectuó por vía intraperitoneal suspendiendo las glándulas en solución fisiológica 0,9% NaCl; antes de cada inyección se observó, para un

oportuno control, una muestra ovárica mediante biopsia.

El sistema utilizado para la "hipofisación" es el de las dosis graduales. Se utilizaron cuatro metodologías:

- 1: dosis de 1/8; 1/4; 1/2; 3/4; 1; 1,5; 3 y 4,5 hipófisis/kg vivo con intervalos de aplicación de a) 6hs entre dosis; b) 12 hs entre dosis; c) 24 hs entre dosis.

- 2: dosis de 1/2; 1; 3 y 5 hipófisis/kg vivo con intervalos de aplicación de 4 hs entre dosis.

- 3: dosis preparatoria de 3 hipófisis/kg vivo y dosis resolutive de 6 hipófisis/kg con intervalo de aplicación de 12 hs.

- 4: dosis única masiva de 9,5 hipófisis/kg vivo.

- Control: solución fisiológica 0,9%, 1,5 ml cada 6 hs.

Luego de la última inyección, a los mismos intervalos de tiempo usados durante el suministro hormonal, se controló el estado ovocitario mediante biopsia hasta obtener una ovulación o pruebas de deterioro de los ovocitos.

Durante el curso de la inducción hormonal se han controlado diversos parámetros que se considera afectan la acción hormonal o sirven como indicadores de su efecto y de la viabilidad de los desoves. Se ha registrado el diámetro de los ovocitos más desarrollados (OVII) y de los acompañantes vitelados (OVI) así como sus correspondientes porcentajes y los de los ovocitos en atresia; también

se ha registrado la posición de la vesícula germinal calculando un índice del estado de maduración (E). Luego de 24 hs se ha repetido el registro, principalmente de los ovocitos VII. Se controló el tiempo que tarda en llegar a la RVG mediante muestras sucesivas a intervalos mínimos de 4 hs asimismo se registró el tiempo hasta la ovulación desde el inicio de la inducción (TMAD) y se ha registrado el tiempo durante el cual se extiende el desove mediante masajes abdominales repetidos cada hora o 2 hs. Luego de registrar el peso de los desoves parciales y culminado el desove o constatado el deterioro de los ovocitos más avanzados se ha examinado el estado del ovario remanente.

Cada parámetro fue evaluado con respecto a su relación con la ovulación y con el desarrollo de los ovocitos obtenidos. Se ha utilizado el cálculo exacto de Fisher (Sokal y Rohlf, 1969) para verificar el límite de cada parámetro en el cual se detectan diferencias significativas, para ello se ha partido de la mediana (cálculo no paramétrico de Wood Wertenberg) y sucesivamente se ha trasladado el límite hacia los valores en los cuales se observan cambios significativos en la respuesta.

Se han efectuado pruebas de viabilidad y de envejecimiento de los ovocitos obtenidos. Los desoves fueron fertilizados poniendo en contacto las gametas antes de colocarlas en agua, por el llamado "método seco" (Espinach Ros et al, 1984 a). Lotes de 200-300 ovocitos, captados cada dos horas, fueron fertilizados y se dejaron desarrollar en cajas de Petri provistas de aireación. Producida la eclosión (65 hs a 22-24º C) se controló el número de larvas

normales, malformadas y muertas confrontando el desarrollo con las tablas normales (Matkovic y Pisanó, 1985, 1986, 1989 a y b).

B.GCH (Endocorion, ELEA) disuelta en solución fisiológica (0,9% NaCl). Se suministraron dos dosis intraperitoneales de 2000-3000 UI/kg con un intervalo entre aplicaciones de 12 hs.

C. Progesterona (Prog) (RUSSELL) disuelta en alcohol etílico 100% - Propilenglicol (1:1) máximo 10% en sol. fisiológica (0,9% NaCl) o bien PROLUTON (Prog. 100 mg en medio oleoso, SHERING) suministrada:

C1: Prog en 5 dosis de 67 mg/kg inyectadas cada 6 hs IP.

C2: Proluton en 1 dosis de 100 mg/kg intramuscular.

D. Desoxicorticosterona (DOC) (DOCABOLIN, ORGANON) como fenilpropionato de desoxicorticosterona 10 mg + fenilpropionato de Nandrolona (anabólico) en vehículo oleoso. Suministrada:

E1: 2 dosis de 10 mg/kg inyectadas cada 12 hs. intraperitoneal.

E2: 2 dosis de 10 mg/kg inyectadas cada 12 hs intramuscular.

E. Antiestrógeno: Citrato de clomifene (CLOM) (Genozym, ARGENTIA) suspendido en sol. fisiológica (0,9% NaCl) e inyectado intraperitoneal. Se suministraron 4 dosis de 50 mg/kg cada 24 hs.

El registro de la acción hormonal sobre la maduración final se efectuó mediante repetidas canulaciones intraováricas, transparentando luego los ovocitos extraídos

para visualizar la vesícula germinal. Se calculó el índice de Estado de maduración (E):

$$E = (b - (a/2 + c)) \cdot b^{-1}$$

donde a: diámetro de la vesícula germinal, b: diámetro del ovocito, c: distancia entre la periferia de la vesícula germinal y la periferia del ovocito a la altura del micropilo. El estadio más frecuente (Moda) se utilizó para seguir la acción hormonal. También se calculó un índice de maduración:

$$IM = (\sum_1^j n_i \cdot E_i) \cdot (\sum_1^j n_i)^{-1}$$

(promedio ponderado de todos los estadios de maduración). Se consideró a los ovocitos deteriorados con un E = 0. Se realizó un análisis de regresión (Sokal y Rohlf, 1969) del IM respecto al tiempo desde la primera dosis.

III.3 RESULTADOS

a) Selección de reproductores:

El fenotipo masculino presenta un pequeño orificio urogenital ubicado en el extremo de una reducida protuberancia cónica, además al presionar esa zona se proyectan dos formaciones papilares blanquecinas. El fenotipo femenino, en cambio, posee un orificio urogenital más ancho que el del macho, algo hundido y no se evidencian las dos proyecciones. Se encuentran también formas intermedias que no permiten una clara diagnosis de los sexos. De los 122 casos estudiados, utilizando como parámetro el fenotipo y a la vez el método de la biopsia por canulación, se han ob-

tenido para la determinación del sexo, 81 aciertos (66,4%) y 41 errores (33,6%); los errores se deben en este caso principalmente a la presencia de ejemplares inmaduros. Con el fin de constatar el sexo se han practicado laparotomías en varios ejemplares, los cuales luego se recuperaron y permanecieron vivos durante más de una semana.

b) Acción hormonal sobre la espermatogénesis y la espermiación:

Las hormonas ensayadas con el fin de inducir la liberación de semen han sido analizadas en relación con los cambios que producen en el tejido germinal. Figs. 58-61, tabla 11.

a) Los macerados totales de hipófisis homóloga inducen una disminución en las áreas ocupadas por las SPG, SPD y SPZ que se ha probado como significativa (fig. 58). Esta disminución se verifica desde la M1, transcurridas 18 hs desde el inicio del tratamiento y los valores son relativamente estables para las muestras subsiguientes (M2, 3 y 4). No se ha probado en ninguno de los casos una regresión significativa respecto a las dosis crecientes (tabla 11).

Los conductos eferentes y la luz lobular presentan una marcada disminución en su contenido de SPZ, disminución que es más manifiesta en la M4. El conducto deferente en los controles se ha mantenido con escaso contenido no registrando variaciones durante las inyecciones de solución fisiológica (tabla 12).

b) La GCH muestra variación en el área celular de los SPC debida a una disminución importante en la M5, pero, no registrándose ningún otro efecto, no se la con-

	TRATAMIENTO CON			
	HIPOFISIS	GCH	METILTESTOSTERONA	TESTOSTERONA
SPG	P < 0,18 S. 0,05 c=-0,46	P < 0,81 S. NS c=-0,08	P < 0,30 S. NS c=-0,36	P < 0,93 -
SPC	P < 0,93 S. NS c= 0,03	P < 0,05 S. NS c=-0,58	P < 0,77 S. NS c= 0,10	P < 0,72 -
SPD	P < 0,23 S. 0,05 c=-0,42	P < 0,60 S. NS c= 0,17	P < 0,30 S. NS c=-0,37	P < 0,58 -
SPZ	P < 0,16 S. 0,05 c=-0,48	P < 0,19 S. NS c= 0,41	P < 0,50 S. NS c= 0,24	P < 0,05 -
LEYDIG	P < 0,52 c= 0,23	P < 0,26 c= -0,35	P < 0,74 c= 0,19	P < 0,62 -
DENS. SPZ	P < 0,60 c= 0,31	P < 0,07 c=-0,12	P < 0,63 c= 0,19	P < 0,79 -
ATRESIA	P < 0,21 S. NS c=-0,43	P < 0,32 S. NS c= 0,31	P < 0,19 S. NS c=-0,45	P < 0,58 -

Tabla 11: Significación del ANOVA, del Test no paramétrico de los signos (S) y coeficiente de correlación (c) para los diferentes elementos celulares en cada tratamiento efectuado.

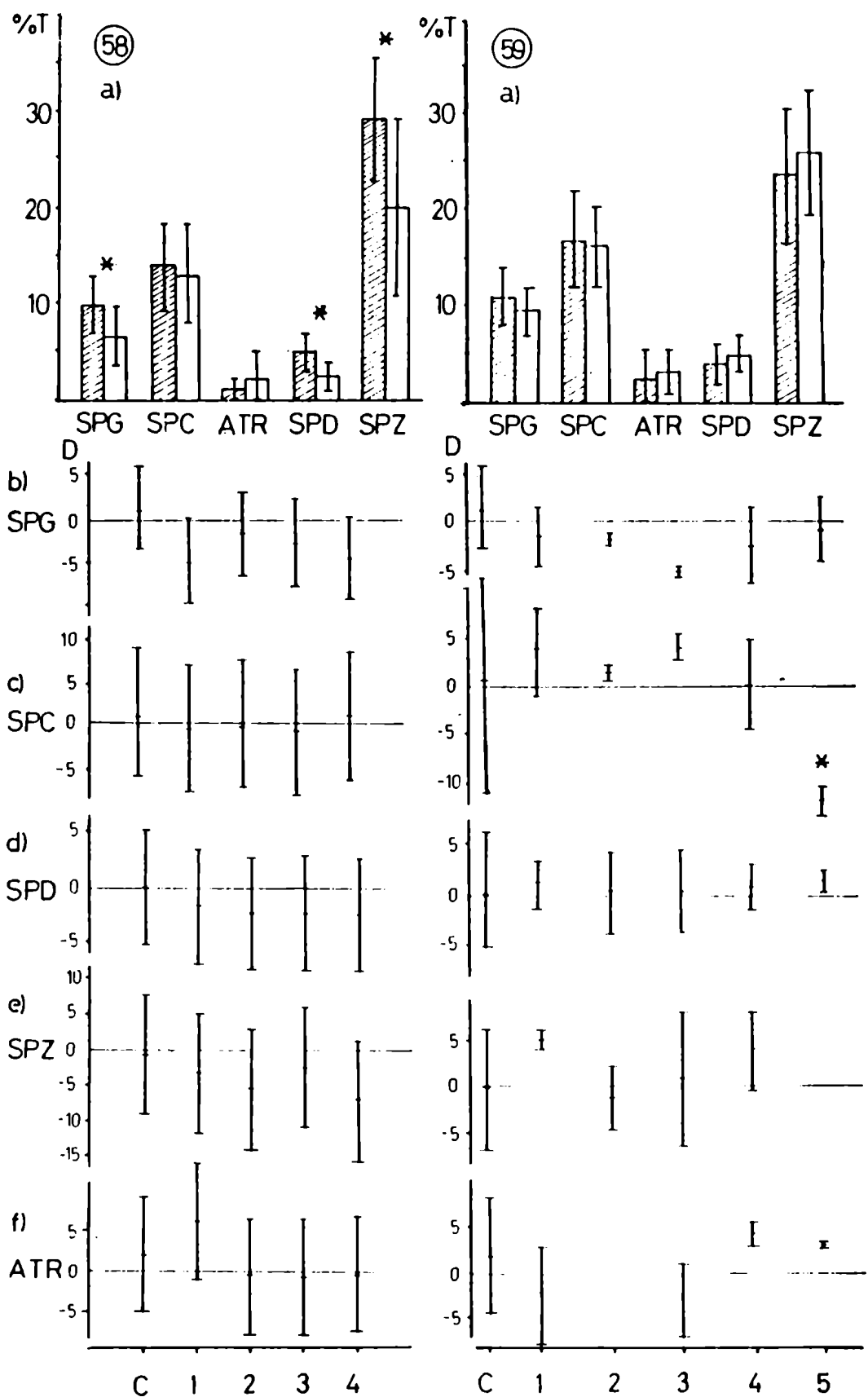


Fig. 58; Acción de los macerados de hipófisis homóloga sobre la espermatogénesis y la espermiación. Fig. 59; Acción de la GCH. Ref; a) promedio porcentual del área ocupada por cada tipo celular considerando el total de los ejemplares tratados; valor inicial (▨), valor final (□); diferencias significativas (*). Diferencias entre la muestra inicial y la muestra final (D=MF-MI) para cada tipo celular en cada muestra (b-f); los valores expresan medias aritméticas y la desviación estándar.

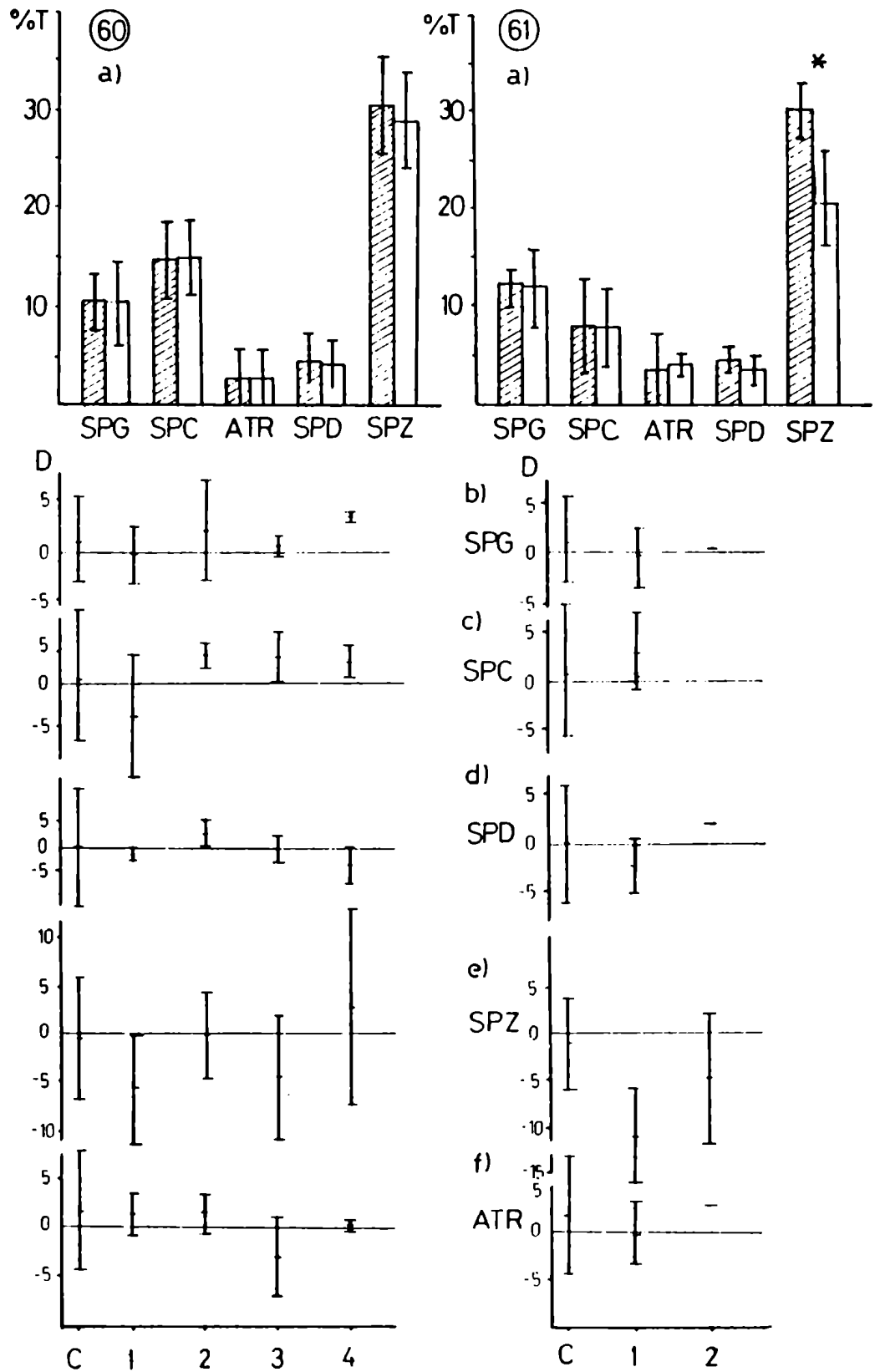


Fig. 60: Acción de la metilttestosterona sobre la espermatogénesis y la espermiación . Fig. 61: Acción de la testosterona. Ref: Idem figuras 58 y 59.

sidera confiable (fig. 59).

c) La Metiltestosterona no evidencia diferencias luego del tratamiento (fig. 60).

d) Testosterona: en los escasos ensayos efectuados se aprecia un descenso en los niveles de SPZ que se revela como significativo (fig. 61). Los valores de los demás elementos no presentan variaciones importantes. En combinación con hipófisis homóloga parece que su acción se potencia.

Los ensayos con hipófisis homóloga repetidos con el fin de verificar la emisión de esperma por presión abdominal suave no han dado resultados positivos en ninguno de los tres esquemas utilizados (Esquema 1, 2 y 3) en los horarios de muestreo.

El ensayo tendiente a verificar posibles diferencias de peso entre los testículos de ejemplares inyectados con hipófisis homóloga y con solución fisiológica no demuestra diferencias significativas, observándose tan solo niveles levemente mayores de hidratación en los testículos tratados con hipófisis (tabla 13). No se observan diferencias entre los pesos frescos ni secos de ambos lotes.

En el ensayo tendiente a verificar si existe espermiación hormonalmente inducida, se ha observado microscópicamente que en el conducto deferente de los testículos ligados hay una acumulación notable de SPZ, en tanto que en el testículo libre, tanto en el lumen lobular como en el deferente,

MUESTRA	DOSIS (H/Kg)	TIEMPO (hs)	LOBULOS			EFERENTES			DEFERENTE
			MI	MF	DIF	MI	MF	DIF	
M1	2,25	18	2-3	1-2	-1	2-3	1-2	-1	1-2
M2	5,25	24	3	2	-1	3	1	-2	2
M3	9,75	30	3	1-3	-2	2-3	0-1	-2	0-2
M4	15,75	36	3	1	-2	3	0	-3	0
CCNTROL	0	36	3	3	0	2	2	0	1

Tabla 12: Grado de replesión, en SPZ, de los lóbulos eferentes y deferentes en ejemplares tratados con hipófisis homóloga y controles. MI: muestra inicial; MF: muestra final; Dif: MF-MI. Escala: 0: 0-25 % de SPZ en el lúmen, 1: 25-50%; 2: 50-75, 3: 75-100%.

PESO TOTAL (gr)		PESO TESTICULOS (gr)				% HIDRATACION	
A	B	FRESCO		SECO		A	B
		A	B	A	B		
1775	1775	1,100	0,655	0,172	0,197	84,36	69,92
1200	1200	0,940	1,055	0,200	0,220	78,72	79,14
1325	1275	0,945	1,035	0,183	0,167	80,63	83,86
875	900	0,837	0,795	0,140	0,127	83,27	84,02
1925	2100	1,455	1,150	0,240	0,250	83,50	78,26
\bar{x}		1,085	0,971	0,187	0,192	82,09	79,04
MEDIANA		0,945	1,035	0,183	0,197	83,27	79,14
ANOVA						NS	
P. MEDIANA		NS		NS		NS	

Tabla 13: Peso fresco, peso seco e hidratación en ejemplares tratados con hipófisis homóloga (A) y en los controles (B). Media (\bar{x}); Prueba de la mediana de Wood Westenberg (P. Mediana).

DOSIS H/Kg	TIEMPO Hs	DIFERENCIAS MACROSCOP.	DIFERENCIAS MICROSCOPICAS						SERIE SPZ
			DEFERENTES			LOBULOS			
			LIBRE	LIGADO	DIF	LIBRE	LIGADO	DIF	
9,5	24	SI	1	2	1	1	1,3	0,3	COMPL.
9,5	36	SI	1	2,33	1,3	1,3	2	0,6	COMPL.
9,5	48	SI	0,6	1,6	1	1,3	2	0,6	COMPL.
0	48	NO	1	1	0	3	3	0	COMPL.

Tabla 14: Grado de replesión en SPZ de los testículos libres y ligados de ejemplares tratados con hipófisis homóloga en los controles. Escala ídem tabla 13.

los SPZ se encuentran en menor cantidad (tabla 14). Esta diferencia se acentúa desde las 36 hs de iniciado el tratamiento y es manifiesta a las 48 hs en cuya muestra se observa que los deferentes no ligados se encuentran casi completamente evacuados. El ejemplar control, a las 48 hs, no presenta casi espermatozoides en los ductos deferentes del testículo ligado ni del libre en tanto que sus lóbulos permanecen cargados de SPZ comprobándose que no se han movilizado.

c) Envejecimiento de los espermatozoides:

La motilidad media de los SPZ de M.m.malabaricus es de 20 m' prolongándose hasta 40 m' los movimientos direccionales. Los ejemplares, luego de 24 hs de inducidos, conservan estas características; una vez sacrificados y removidos los testículos, se verifica que el 100% de los SPZ son móviles durante las primeras 15-18 hs de conservación en refrigeración. Pero, los testículos conservados durante 48 hs manifiestan motilidad solo en el 50% de los SPZ, reduciéndose a 2,5m' su motilidad media y a 20 m' la máxima (fig. 62).

Los ejemplares, luego de 48 hs de inducidos, presentan un 90% de los SPZ con una motilidad media de 10 m' y la máxima de 30 m', reduciéndose luego de 30 hs de conservación en refrigeración a un 10% con una motilidad media de 2,5 m' y un máximo de 10 m' (fig. 62).

La viabilidad de estos SPZ, controlada sobre una misma hembra (fig. 13), permite observar que los SPZ recién extraídos de un ejemplar sin inducir presentan un 82% de desarrollo normal, en tanto que los inducidos durante 24

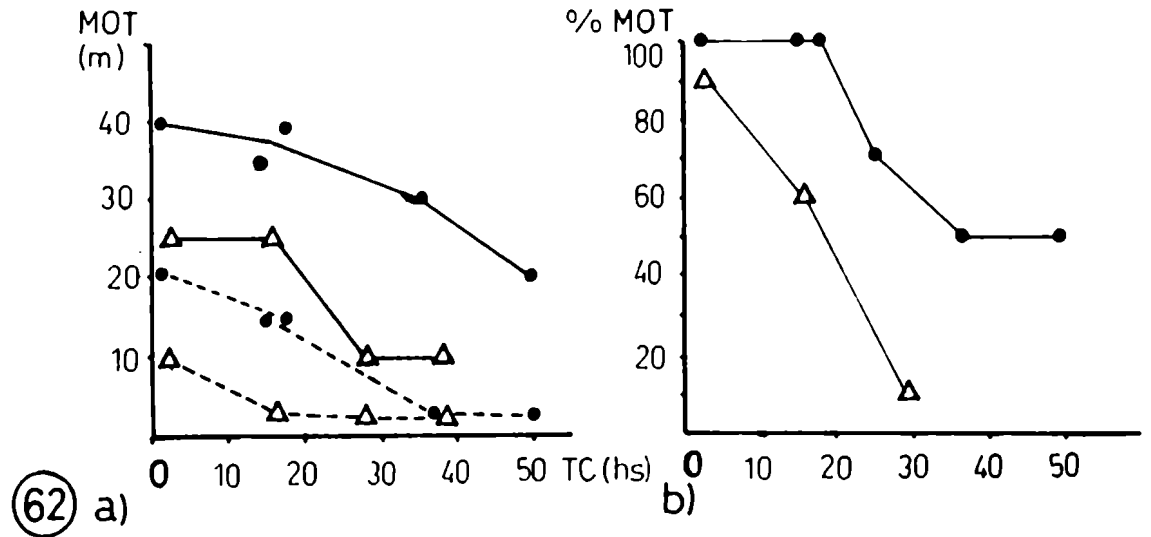


Fig. 62; Motilidad de los SPZ. a) motilidad direccional máxima (línea llena) y media (línea de trazo) de los SPZ frescos (0) y conservados en refrigeración (TC) en ejemplares inducidos con hipófisis homóloga durante 24 hs (•) y 48hs (Δ). b) porcentaje de motilidad (%M) a distintos tiempos de conservación en refrigeración (TC) en ejemplares inducidos por 24 hs (•) y 48hs (Δ). Fig. 63: Viabilidad de los SPZ obtenidos de testículos frescos (FR), de testículos inducidos por 48 hs y conservados por 24hs en refrigeración (A) e inducidos por 24 hs y conservados por 48 hs (B). Se ha registrado el porcentaje de embriones normales (□), malformados (▨) y muertos (▩) a las 65 hs de desarrollo (eclosión).

y 48 hs mantenidos en refrigeración durante 48 y 24 hs respectivamente presentaron un 41-42 % de desarrollo normal y porcentajes de alrededor de 30% de defectuosos y otro tanto de muertos.

d) Cultivo in vitro de tejido ovárico:

Ovocitos mantenidos in vitro presentaron varias características que indican un proceso de deterioro. La primera es la translación de la vesícula germinal hacia la periferia no micropilar, ubicándose en la zona superior del ovocito independientemente de la posición de éste. La vesícula germinal puede sufrir con el tiempo un proceso de desaparición a la vez que se observan cambios en la disposición del citoplasma que se entremezcla con el vitelo, característica observada también in vivo durante el proceso de atresia. Además, el ovocito se separa de la membrana vitelina y de las cubiertas celulares que lo rodean y finalmente se vuelve blanquecino opaco con el aspecto típico de las células en lisis.

Ensayos previos efectuados sobre ovocitos deteriorados experimentalmente, sometiéndolos a condiciones osmóticas adversas por 18 hs, demostraron que los ovocitos que presentan aspecto avanzado de deterioro se tiñen con Eosina azulada y Fast green. Esta coloración se mantiene por lo menos por 30 minutos. Entre los ovocitos con aspecto normal, solo un bajo porcentaje de los ovocitos previtelogénicos incorporó los colorantes.

El pH refleja dos aspectos: uno es el metabolismo celular y otro es la capacidad buffer del medio

de cultivo. En los ensayos in vitro se observó que en todos los medios el pH se mantiene dentro de los límites fisiológicos hasta las 48 hs (tabla 15).

Los cuatro medios ensayados (tabla 10) permiten el cultivo de fragmentos ováricos por 48 hs sin renovación del medio (tabla 15). Luego de ese lapso el porcentaje de ovocitos con evidencias de deterioro supera el 50% y alcanza el 70-90% a las 72 hs. El TBSS es el medio que presentó menor porcentaje de ovocitos deteriorados y por esa característica lo hemos elegido. Sin embargo su capacidad buffer es relativamente baja.

La presión osmótica del TBSSh se ajustó a la del suero de H.m.malabaricus durante la época reproductiva. La presión osmótica de las muestras de suero con EDTA fue de \bar{X} : 331,15 mMol/kg (σ n-1: 18,209 mMol/kg, n: 10). La solución de EDTA utilizada de 840,46 mMol/kg. La presión osmótica calculada del suero de H.m.malabaricus : 280,14 mMol/kg. Se ajustó una solución parcialmente preparada de TBSS con NaCl de forma tal que la concentración final de NaCl es de 8,35 g/l en vez de 8,6 g/l del TBSS original (tabla 10).

e) Acción hormonal in vitro:

Los resultados de la serie de ensayos, efectuados con TBSSh se condensan en la tabla 16. A las 24 hs de incubación se registra actividad hormonal entre los esteroides; se obtuvieron respuestas significativas con 17α 20β DHP, DOC y Prog. El máximo de RVG se obtuvo con 100 μ g/ml de Prog (45,5%); la 17α 20β DHP en concentraciones de 10 μ g/ml pre-

Medio	T Incubación	24 hs		48 hs		72 hs	
		pH	%ODET	pH	%ODET	pH	%ODET
CBSS		7,9	30	7,5	50	7	80
TBSS		7,4	10	7	20	6,9	70
CORTLAND		7,4	20	7,4	40	7	80
EARLE		8	10	8	50	8	90

Tabla 15: Ensayo sobre la capacidad que presentan los medios señalados en la tabla 10 para mantener en cultivo tejido ovarico. Porcentaje de ovocitos deteriorados (%ODET).

Hormona	Conc.	24 hs				48 hs			
		%RVG	n	M	%ODET	%RVG	n	M	%ODET
Hipofisis NS(P<0,05)	18 mg/ml	0	93	0	33	4,25	98	17	63
	1,8 "	0	79	0	49,5	0	92	0	81
	0,18 "	2,5	78	10	30,5	0	73	0	88
	0,0018"	0	95	0	42	2,25	96	9	71
GCH NS(P<0,05)	1000UI/ml	1	84	4	53	7,75	76	21	72
	100 "	0	89	0	64	0	76	0	71
	10 "	0	82	0	57	2,75	86	11	72
	0,1 "	0	82	0	65	1,25	71	5	76
Prog * (P<0,1) a las 24hs	100 µg/ml	45,5	57	74	28	12	55	23	73
	10 "	8	39	12	15	29,5	48	36	46
	1 "	4	57	5	36	8,5	30	17	63
	0,01 "	0	61	0	43	0	42	0	77
17 α 20 β DHP * (P<0,05) a las 24hs	100 µg/ml	-	-	-	-	10	40	20	62,5
	*10 "	38,5	99	53	20	11,2	93	28	70
	1 "	7	72	10	26	1,25	76	5	78,5
	0,1 "	0	52	0	52,5	2	44	4	72,5
	0,01 "	1,2	99	5	52	6	77	24	79
DCC * (P<0,05) a las 24hs	100 µg/ml	17,5	40	30	20	20	43	30	62,5
	10 "	28	79	41	29,5	24	95	73	57
	1 "	13	75	35	37	1,25	88	5	82
	0,1 "	1,5	49	3	39,5	6,5	33	13	70
	0,01 "	2,5	78	5	43	1,7	63	5	81
TBSSh		0	159	0	57,5	0	160	0	89,5
TBSSh + ETANOL-PROP.		0	119	0	62	0	168	0	83

Tabla 16: Acción hormonal *in vitro*. Refs: Porcentaje de RVG (%RVG), número de ovocitos contados (n), porcentaje de ovocitos deteriorados (%ODET), porcentaje máximo de RVG observado en ensayos individuales (M). Los resultados fueron analizados con un ANOVA (P<0,05) y por contrastes de Tukey; No significativo (NS), significativo (*).

senta 38,5% RVG y la DOC (10 µg/ml) un 28% RVG. A las 48 hs la máxima actividad se aprecia con la Prog (10 µg/ml) obteniendo un 29,5% RVG, la DOC (10 µg/ml) un 24% RVG y la 17α 20β DHP (10µg/ml) presenta un 11,25% RVG, actividades que en ningún caso se demostraron como estadísticamente significativas (P < 0,05). A las 72 hs la actividad decrece y es elevado el porcentaje de ovocitos deteriorados.

Considerando los máximos valores obtenidos en ensayos individuales (tabla 16) se encuentra que el más alto porcentaje es de 74% RVG con 100 µg/ml de Prog a las 24 hs de incubación; le sigue un 54% RVG con 10 µg/ml de 17α 20β DHP a las 24 hs y un 41% RVG con 10 µg/ml de DOC a las 24 hs.

En forma relativa a las concentraciones empleadas la 17α 20β DHP parece ser la más activa, seguida por la Prog y la DOC.

Las gonadotrofinas presentan solo un 7,75% RVG a las 48 hs con altas concentraciones de GCH (1000 UI/ml), en tanto que la hipófisis no parece presentar actividad in vitro, ni como macerado, ni como extracto alcohólico.

f) Acción hormonal in vivo:

- Hipófisis: La acción hormonal ha sido estudiada utilizando la escala numérica del estado de maduración (E) en función de la migración, ruptura de la vesícula germinal, sucesiva ovulación o eventual deterioro de los ovocitos. De acuerdo con esta relación se subdividió la escala determinando que:

La vesícula germinal central (VGC) posee un $E = 0,5 \text{ } \& \text{ } 0,55$.

La vesícula germinal lateralizada (VGL) posee un $E = 0,56 \text{ á } 0,75$

La vesícula germinal subperiférica (VGSP) posee un $E = (\frac{1}{2} \varnothing VG - 0,76) \cong 0,76 \text{ á } 0,86$.

La vesícula germinal periférica (VGP) posee un $E = (0,99 - \frac{1}{2} \varnothing VG) \cong 0,87 \text{ á } 0,99$

Ruptura de la vesícula germinal (RVG), posee un $E = 1$

Los resultados de cada ensayo de estimulación por medio de hipófisis homóloga se encuentran consignados en la tabla 17 y la fig. 64.

En todos los casos un aumento en la dosis durante el suministro gradual está relacionado con un incremento del índice del estado de maduración (E). Esta respuesta concluye casi siempre con la ruptura de la vesícula germinal ($E = 1$) que se verifica en promedio en 30 hs (24-36 hs) para H1, en 28,5 hs (24-35 hs) para H2 y en 24 hs para H3.

En los tratamientos H1a, H2 y H3 se obtuvo ovulación; los "tiempos de latencia" entre la última dosis y la ovulación fueron de 8 ± 8 hs, $27,5 \pm 5$ hs y $24 \pm 2,5$ hs para cada tratamiento respectivamente. El lapso entre la primera dosis y la ovulación (tiempo de maduración - TMAD) es de 51 hs (45-60) para H1a, 39 hs (30-49) para H2 y 36 hs (33-39) para H3.

El tratamiento H4, que suministra la "dosis efectiva" en una sola aplicación (9,5 H/kg), provoca la ruptura de la vesícula germinal pero no la ovulación.

Cabe señalar que los ovocitos luego de la ruptura de la vesícula germinal si no ovulan sufren un evidente deterioro (tabla 17, fig. 64).

Durante el mantenimiento previo así como en el ejemplar control se evidenció un decremento del estado

TRATAM.	COMPOSICION INICIAL				COMPOSICION 24HS		TRVG	OVULACION		COMPOSICION P.D.	DESARROLLO	PROMEDIOS					
	E	Ø1	%1	Ø2	%2	%D		Ø1	%1				TMAD	WDESOLVE	MOVARICIE	E	Ø1
H1a	.84	1.48	-	-	-	-	-	-	12	-	-	1	1.6	-	NORMAL	DESOVA EL 60%	
	.77	1.60	-	-	-	.87	1.60	-	60	30	91	1	1.6	-	NORMAL	NORMALES 67%	
	.75	1.37	-	-	-	1	-	98	NO	-	148	1	1.53	100	-	WDESOLVE 62gr	
	.68	1.53	82	.94	18	0	1	-	95	24	45	94	158	-	ANORMAL	TRVG 30hs	
	.7	1.51	67	1.36	36	0	.91	-	-	NO	-	114	.91	-	90	-	TMAD 51
	.7	1.48	-	1.3	-	-	.97	1.52	-	49	-	-	1	1.64	-	NORMAL	
H2	.77	1.54	-	-	-	1	1.60	-	30	65	150	1	1.76	-	NORMAL	DESOVA EL 80%	
	.6	1.54	-	-	-	.94	-	-	39	16	134	1	1.71	100	ANORMAL	NORMALES 75%	
	.64	1.5	83	1.3	10	7	.9	-	35	NO	116	1	-	50	-	WDESOLVE 57gr	
	.77	1.49	48	1.41	28	24	.92	-	73	34	< 10	90	1	1.57	100	ANORMAL	TRVG 28,5hs
	.80	1.32	80	-	-	-	.93	-	55	NO	-	48	.93	-	100	-	TMAD 39hs
	.72	1.49	84	1.25	17	0	1	-	100	37	78	112	1	1.61	-	NORMAL	
H3	.77	1.55	99	-	0	1	-	94	36	120	154	1	-	-	NORMAL	DESOVA EL 80%	
	.81	1.54	98	-	0	2	.94	1.56	96	39	61	85	-	-	NORMAL	NORMALES 75%	
	.64	1.48	90	1.32	10	0	-	-	41	48	68	-	-	-	NORMAL	WDESOLVE 44gr	
	.86	1.52	-	-	-	-	.93	1.60	-	NO	-	192	1	1.76	-	DESCVA EL 80%	
	.79	1.43	-	-	-	-	1	1.48	-	36	101	137	1	1.55	-	NORMALES 75%	
	.66	1.37	68	.74	27	5	1	1.52	100	39	< 10	45	-	-	-	ANORMAL	TRVG 24hs
.62	1.47	78	.85	10	12	1	1.54	95	36	12	71	-	-	-	ANORMAL	TMAD 36hs	
.78	1.55	87	.96	13	0	1	1.61	95	33	53	70	-	-	-	NORMAL		

Tabla 17: Efecto de la inducción con hipófisis homóloga *in vivo*, tratamientos H1a, H2 y H3. Se han registrado los parámetros: Estado de maduración (E), diámetro de los ovocitos más avanzados (Ø1), porcentaje de los ovocitos más avanzados (%1), diámetro de los ovocitos acompañantes (Ø2), porcentaje de los ovocitos acompañantes (%2), porcentaje de ovocitos en atresia (%D), tiempo hasta la ruptura de la vesícula germinal (TRVG), tiempo hasta la ovulación (TMAD).

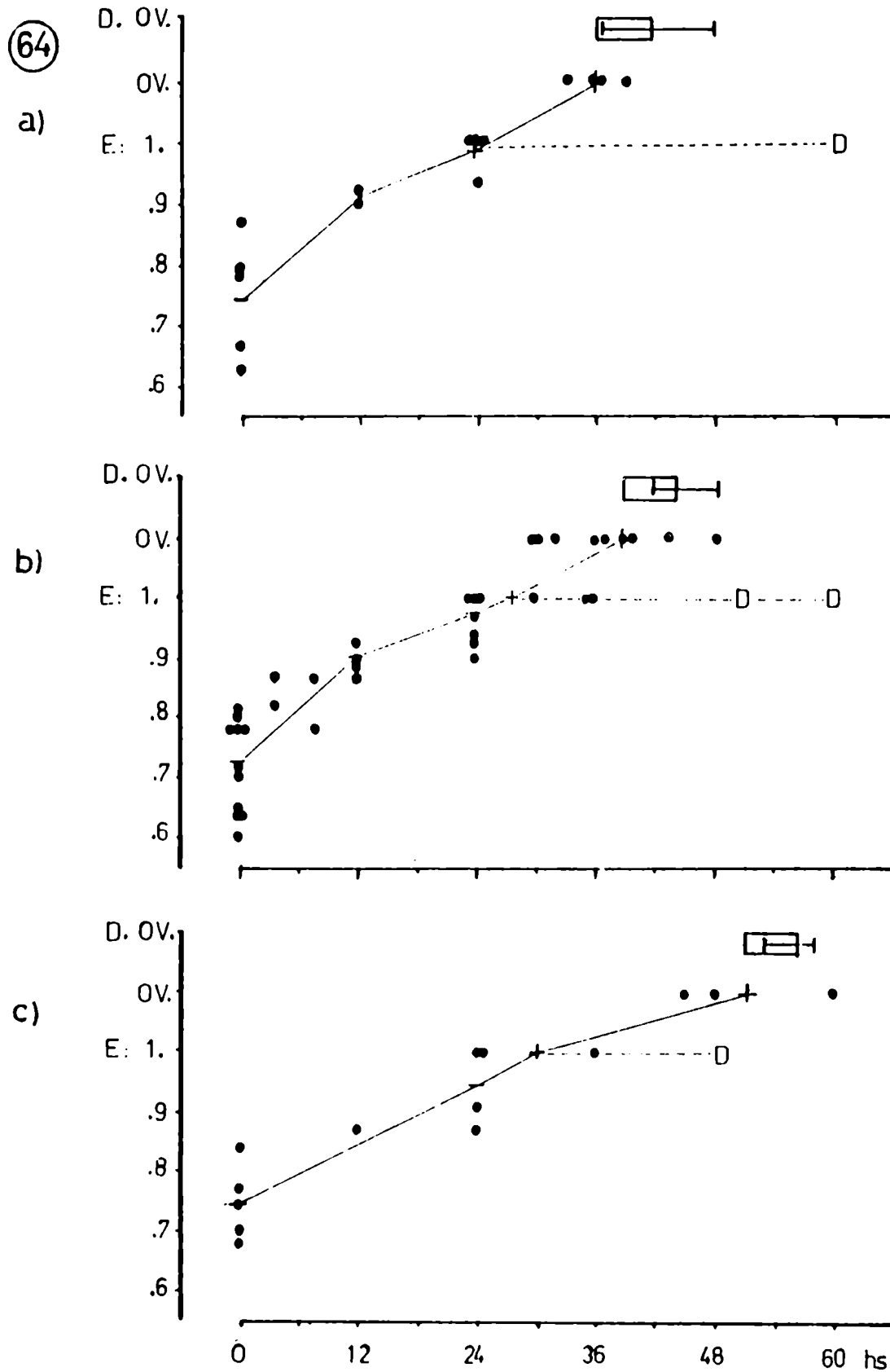


Fig. 64: Evolución de la inducción con hipófisis homóloga para cada tratamiento con hipófisis: H3 (a), H2 (b), H1a (c). Se ha medido el estado de maduración (E), la ovulación (OV), la Atresia (D) y la Duración de la ovulación (D OV).

de maduración, en algunos ejemplares este hecho se siguió manifestando durante las primeras dosis de la estimulación hormonal, pero con el tratamiento sucesivo se produce el incremento del E (fig. 65).

El peso de la hipófisis fresca de Hoplias m. malabaricus en la época reproductiva es de 11,61 mg (\pm 4,65 mg) así como el peso seco es de 1,78 mg (\pm 0,66 mg). La equivalencia del total inyectado por kg es de:

Tratamiento	Hipófisis/kg	Peso fresco (mg/kg)	Peso seco (mg/kg)
1	11,625	134,97	20,69
2 y 4	9,5	110,29	16,91
3	9	104,49	16,02

Los distintos parámetros medidos durante el transcurso de la inducción hormonal evidencian variada relación con la ovulación y el normal desarrollo. (Tabla 18). El diámetro de los ovocitos más desarrollados (OVII) se encuentra relacionado con la respuesta hormonal, estimándose que ovocitos de diámetro menor a 1,425 mm presentan escasa probabilidad de ser inducidos a ovular; en cambio, la posición de la vesícula germinal (Ei) de estos ovocitos no ha demostrado tal influencia. La composición del ovario es determinante en la respuesta hormonal, ya que el porcentaje de ovocitos vitelados (OVI) acompañantes debe ser menor del 18% y debe haber menos del 5% de ovocitos en atresia para lograr ovulaciones. La posición de la VG a las 24 hs de iniciada la inducción (E24) y el tiempo que transcurre hasta la ruptura de la vesícula germinal (TRVG) constituyen buenos índices de la evolución del ensayo;

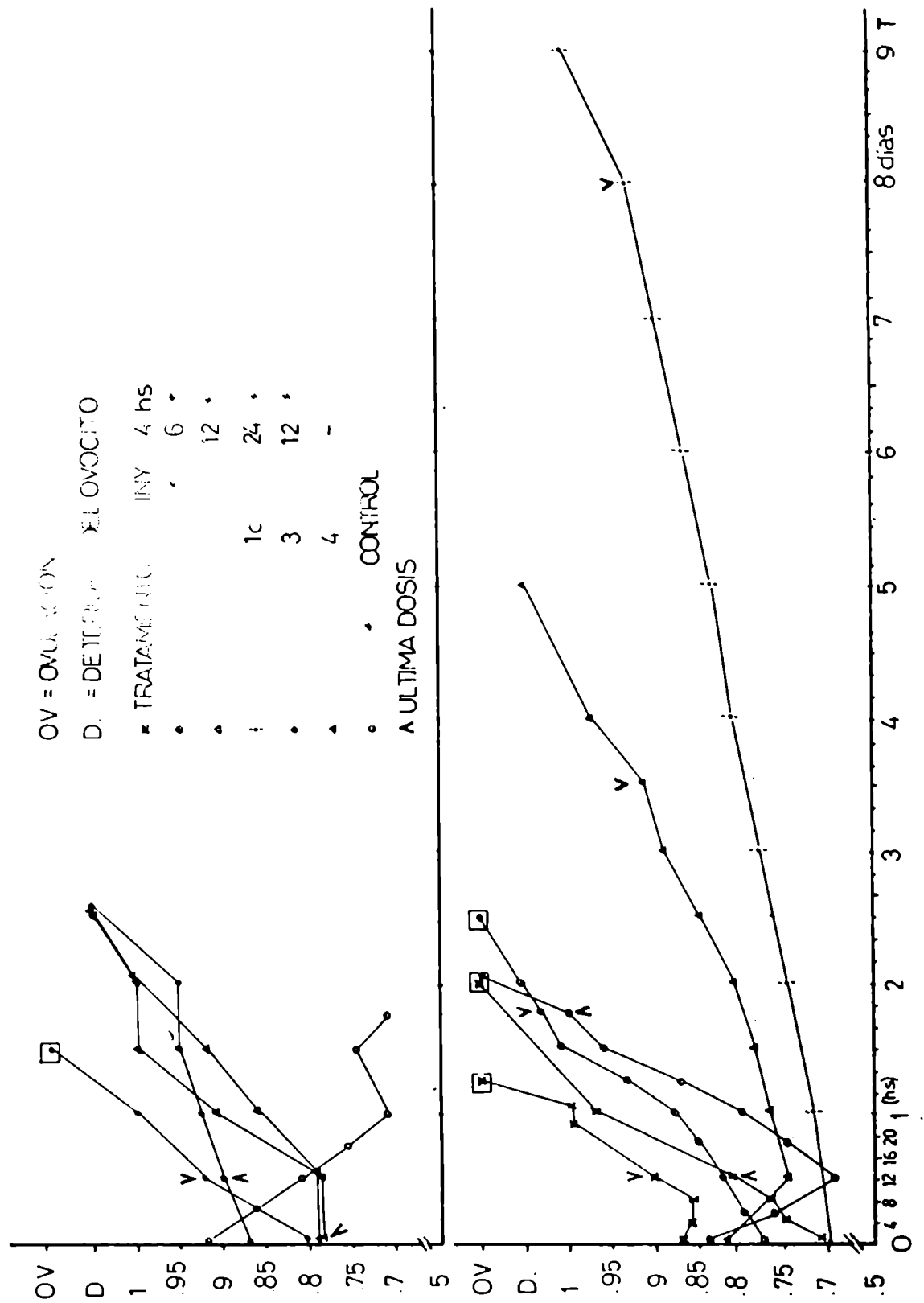


Fig. 65: Evolución de la inducción con hipófisis homóloga en cada tratamiento efectuado y en el control, se ha registrado el índice E para cada ejemplar por separado. Nótese el descenso del E en el ejemplar control y en algunos ejemplares durante las primeras horas de tratamiento.

Ø 1 (mm)	E1		% O 2		% DET		E 24		TRVG (hs)		W OV (g)		TMAD (hs)	
	OVULACION SI NO	OVULACION SI NO	OVULACION SI NO	OVULACION SI NO	OVULACION SI NO	OVULACION SI NO	OVULACION SI NO	OVULACION SI NO	OVULACION SI NO	OVULACION SI NO	OVULACION SI NO	OVULACION SI NO	OVULACION SI NO	OVULACION SI NO
1,32	1	2	0	2	0	3	1	.74	24	9	1	40	1	1
1,37	1	3	1	2	1	1	1	.85	29	1	1	60	1	
1,42	1	2	13	1	2	1	5	.9	30	1	1	70	2	
1,43	1	1	18	1	7	1	2	.95	34	1	1	80	2	
1,47	1	1	22	1	19	1	8	1.	35	1	2	90	2	
1,48	2	1	23	1	25	1	1		36	1	1	110	1	
			36	1								120	2	
												130	2	
												140	3	
												150	3	
												190	1	
M 1,475	M 0,75	M 13	M 1,5	M .95	M 29	M 110	M -	M -	M 29	M 110	M -	M -	M -	M -
L 1,425	L -	L 18	L 5	L .95	L 29	L -	L -	L -	L 29	L -	L -	L -	L -	L -
S P<.05	S NS	S P<.02	S P<.05	S P<.05	S P<.05	S P<.05	S P<.05	S P<.05	S P<.05	S P<.05	S NS	S NS	S NS	S NS
DESARROLLO N. A.	DESARROLLO N. A.	DESARROLLO N. A.	DESARROLLO N. A.	DESARROLLO N. A.	DESARROLLO N. A.	DESARROLLO N. A.	DESARROLLO N. A.	DESARROLLO N. A.	DESARROLLO N. A.	DESARROLLO N. A.	DESARROLLO N. A.	DESARROLLO N. A.	DESARROLLO N. A.	DESARROLLO N. A.
1,37 1		0	0	.92	0	3	1					30	2	
1,43 1		10	1	.94	1	1	1					33	1	
1,47 1		13	1	.95	2	1	1					36	2	1
1,48 5		17	1	1.	5	1	2					37	1	1
		18	1		12	1	1					39	2	1
		28	1		24	1	1					41	1	1
												43	1	1
												45	1	1
												48	1	1
												49	1	1
												60	1	1
M 1,48		M 13	M 5	M .94	M 5	M 5	M .94	M -	M -	M -	M -	M -	M 39	M 39
L -		L 17	L 5	L -	L 5	L 5	L -	L -	L -	L -	L -	L -	L -	L -
S NS		S P<.1	S P<.1	S NS	S P<.1	S P<.1	S NS	S -	S -	S -	S -	S -	S NS	S NS

Tabla 18: Relación de los parámetros ováricos con la inducción de la ovulación y el desarrollo. Cálculo de los límites en los que se comienzan a observar cambios significativos en la respuesta. Ref.: Ø 1: Diámetro de los ovocitos vitelados (OVII); E1: Estado inicial; %: % ovocitos en vitelogénesis (OVI); %DET: % atresicos; E24: Estado a las 24 hs de inducción; TRVG: tiempo hasta la ruptura de la vesícula germinal; WOV: peso del ovario; TMAD: tiempo hasta la ovulación; M: mediana; L: límite; S: nivel de significación NS: no significativo; N.: Normal; A.: Abortivo.

se ha observado que los ejemplares con E24 menor de 0,95 y TRVG mayor de 29 hs presentaron escasas probabilidades de ovular. El peso del ovario, entre los 40 y 190 g , no parece estar relacionado con la ovulación; el peso del desove se asociaría con un desarrollo anormal solo si es muy escaso (menos de 10 g) El tiempo de maduración (TMAD) no condiciona el normal desarrollo.

Los desoves obtenidos por masaje abdominal suave tuvieron pesos de entre 30 y 94 g (\bar{W} : 62g) con H1a, 10-120 g (\bar{W} : 57g) con H2 y 10-101g (\bar{W} : 44g) con H3; el ovario remanente pesó $62,5 \pm 2,5$ g con H1a, $56,4 \pm 37,7$ g con H2 y $36,7 \pm 17,2$ g con H3; el examen determina que aún posee ovocitos en maduración avanzada de los cuales un 50-100% se encuentran deteriorados (tabla 17).

Los ovocitos fertilizados se desarrollan normalmente (Matkovic y Pisanó, 1985, 1986, 1989 a y b) y los embriones llegan hasta la eclosión en un 67% de los casos con el tratamiento H1a y en un 75% en H2 y H3 (tabla 17).

Los ensayos para determinar envejecimiento (tabla 19) son preliminares; obteniéndose que los porcentajes de ovocitos normales se encuentran en baja proporción (37-65%). El tiempo de envejecimiento de los ovocitos, de acuerdo con estos ensayos, sería de 4 á 6 hs luego de los cuales los ovocitos ya se presentan polarizados y no desarrollan embriones.

- Los ensayos efectuados con GCH (fig. 66) no presentan efecto de maduración; además, hay una leve correlación nega-

tiva del Índice de Maduración (IM) en función del tiempo ($r = -0,5$).

- La Progesterona presenta acción inductora de la maduración final en el término de 24 hs (18°C) con un coeficiente de correlación de 0,95. Los ovocitos alcanzan la RVG en proporciones que llegan al 100% en ambas modalidades de suministro (C1 y C2), sin embargo éstos no continúan su evolución y la ovulación no se produce; por el contrario, 24 á 48 hs después los ovarios se atresian (fig. 67).

- La Desoxicorticosterona (DOC) presentó diferencias entre la inyección intraperitoneal y la intramuscular. En la primera, a las 48 hs se alcanzó un 47% RVG en tanto que en la segunda (si bien hubo un aumento en el IM) no llegó a producir maduración final (fig. 68).

- El suministro del antiestrógeno CLOM no induce maduración final pero mantiene el IM relativamente constante durante cuatro días, luego hay atresia (fig. 69).

Comparando la acción in vitro con la in vivo (tabla 20) se observa que las hormonas que han presentado una acción significativa son esteroideas. La Prog. presenta el mayor porcentaje de RVG tanto in vitro como in vivo luego de 24 hs de tratamiento. La concentración más elevada ensayada in vitro (100 µg/ml) presentó un 45,5% RVG mientras que la mínima concentración ensayada in vivo un 100% RVG, a ambas se les asignó una Eficiencia Relativa de 1. La Desoxicortixosterona presenta en ambos ensayos aproximadamente un 50% de la acción de la Prog (Eficiencia Relativa de 0,47 y

TIEMPO (hs)	NORMALES (%)	MALFORMADOS (%)	MUERTOS (%)	CARACTERISTICAS	DESARROLLO
0	39-37	15-20	46-43	NORMALES	ECLOSIONAN
2	37	60	3	NORMALES	ECLOSIONAN
4	65-0	14-0	21-100	NORMALES- POLARIZADOS	ECLOSIONAN ABORTIVOS
6	0	0	100	POLARIZADOS	ABORTIVOS
8	0	0	100	POLARIZADOS	ABORTIVOS
10	0	0	100	POLARIZADOS	ABORTIVOS

Tabla 19: Envejecimiento de los ovocitos obtenidos durante dos ensayos con H₂.

Figura 66: Regresión lineal del IM en función del tiempo desde el inicio del tratamiento con GCH in vivo

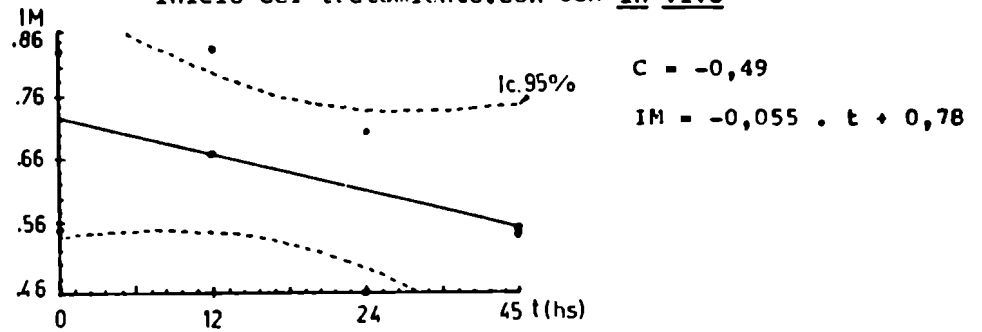


Figura 67: Regresión lineal del IM en función del tiempo desde el inicio del tratamiento con Prog in vivo.

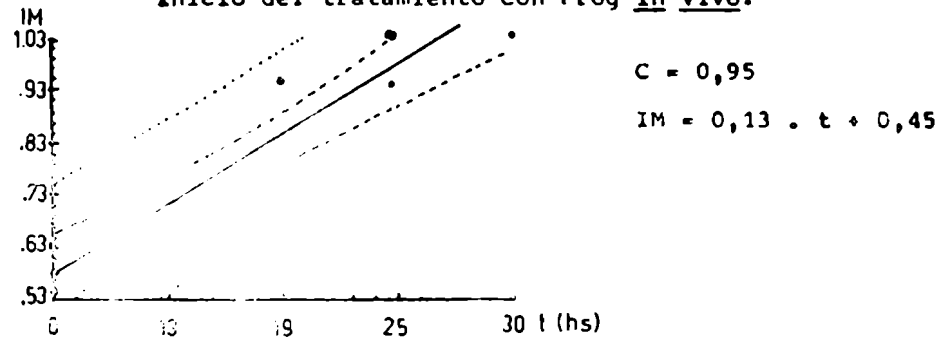


Figura 68: Regresión lineal del IM en función del tiempo desde el inicio del tratamiento con Doc in vivo.

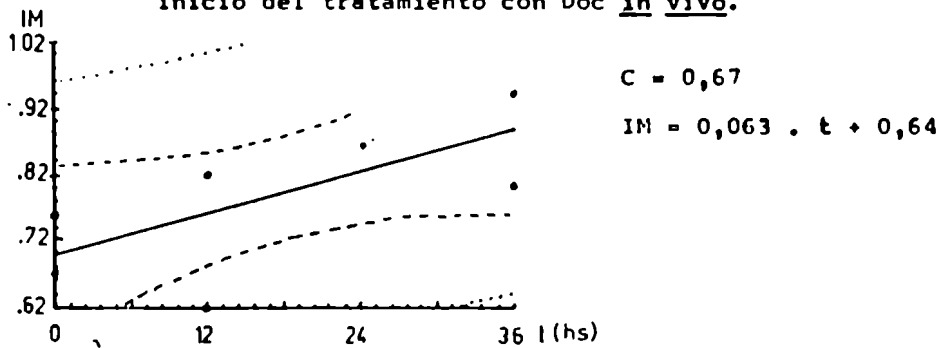
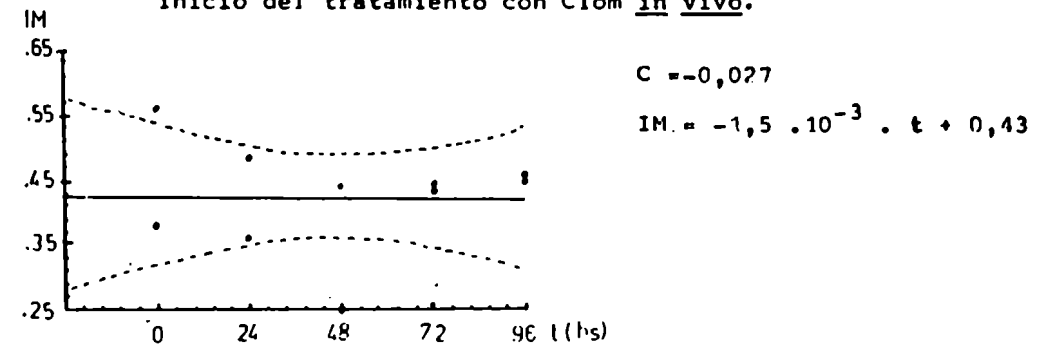


Figura 69: Regresión lineal del IM en función del tiempo desde el inicio del tratamiento con Clom in vivo.



Hormona	<u>In vitro</u>				<u>In vivo</u>			
	24hs		48hs		24hs		48hs	
	%RVG	CONC.	%RVG	CONC	%RVG	CONC	%RVG	CONC
Prog	45,5 ER:1	100µg	-	-	100 ER:1	100mg	-	-
DGC	28 ER: .62	10 µg	24 .53	10µg	47 .47	20mg	-	-
GCH	- ER:	-	7,75 .17	1000 UI	0 0	4000 UI	0 0	4000 UI
Hipófisis	- ER:	-	4,25 .09	18mg	100 1	16-20 mg	-	-
17α 20βDHF	38,5	10µg	-	-	-	-	-	-

Tabla 20: Comparación entre la acción hormonal in vitro e in vivo. Eficiencia relativa (respecto a la progesterona) (ER), concentración en µg, mg o UI/ml (CONC).

0,62). La GCH recién a las 48 hs presenta un bajo porcentaje de RVG in vitro (Eficiencia Relativa 0,17) que no se observa in vivo. La Hipófisis, prácticamente inactiva in vitro, es igualmente activa que la Prog in vivo (Eficiencia Relativa de 1), su acción se prolonga entre las 24 y 48 hs y es hasta el momento la única con la que se logró inducir la ovulación.

III.4 DISCUSION

a) Selección de los reproductores:

En H.m.malabaricus no se aprecia claramente el dimorfismo sexual ni se obtiene emisión de espermatozoides; tampoco la maduración del ovario provoca la distensión abdominal que es típica en otros teleosteos. Lo señalado contrasta con lo que ocurre en muchas especies cuyas características externas han servido de útil parámetro para la selección de reproductores (tabla 21).

Si bien en algunos Siluriformes y en Prochilodus es posible utilizar esas características externas se considera más conveniente analizar los ovocitos obtenidos por biopsias (Lam, 1982; Espinach Ros et al, 1984 a y b). En H.m.malabaricus se ha combinado el examen de la papila urogenital con la biopsia por canulación intraovárica. Por este procedimiento se ha podido obtener casi un 70% de seguridad en la determinación del sexo, siendo útil para seleccionar las hembras. Si bien se pueden extraer ovocitos en estadios muy poco desarrollados, el 30% de error se debe casi exclusivamente a hembras inmaduras que se confunden con

	Selección de reproductores	Donante hipofisis	Conservación hipofisis	Sexo (MC)	Vía	Dosis (mg/kg) • (M/Lg)				Inter-valor (hrs)	Tiempo latencia (hrs)	Referencias
						10	20	30	40			
OSTARIOPICEOS												
Ciprinoides:												
Catla catla	Características externas	C. carpio	alcohol	24-31	IM	2-3	5-8	--	--	4-6	3-6	Lam, 1982
Lebeo rohita	"	"	"	"	"	2-3	5-8	--	--	"	"	"
Cirrhinus mirgala	"	"	"	"	"	2-3	5-8	--	--	"	"	"
Lebeo calbasu	"	"	"	28-33	"	2-3	12-15	--	--	6	7	"
Cyprinus carpio	"	P. gonionotus	frasca	24-27	"	6	6	--	--	5	6-7	"
Hypophthalmichthys molitrix	"	"	"	27-28	IM IP	5-6	5-6	--	--	5	5-6	"
Aristichthys nobilis	"	C. mirgala H. molitrix	alcohol	28-33	IM	3-4	6-8	--	--	6-8	3-6	"
Ctenopharyngodon idellus	"	varias especies	frasca o acetona	24-33	"	0,3-0,7 2-3	1,3-1,7 4-8	--	--	6	5-6	"
Siluriformes:												
Silurus glanis	Otocopia intraovírica	C. carpio	acetona	20-24	"	0,3-0,5	2,7-4,0	--	--	24	12-19	"
"	"	"	"	23	7	0,3	3	--	--	18	14-18	"
"	"	"	"	23-24	7	3,5	--	--	--	--	20-22	"
Rhoadis sepo	Biopsia	P. platensis	alcohol	17-27	IP	0,75-6	--	--	--	--	14(270C) 33(170C)	Espinach Ros et al, 1984 a
Clarias lasera	Edad	C. carpio	acetona	25	IM	4	--	--	--	--	11	Magedorn y Vismara, 1980
Characoides:												
Prochilodus platensis	Biopsia	P. platensis	alcohol	28-29	7	0,2	0,3	0,4	0,5	6	7	Espinach Ros et al, 1984 b
"	Características externas	"	buffer fosfato o glicerina	26-28	7	5	5	5	--	12	3	Bin et al, 1974
Selinus maxillosus	"	"	"	26-28	7	5	5	5	--	12	56-58	"
Hoplias malabaricus	Conducta reproductiva. Laparotomía	7	7	7	7	3/8	1/5-1/4	1/2	3/4	4,3-6	9	Azevedo y Gomes, 1942; Godoy, 1975
NO OSTARIOPICEOS												
Hucho hucho	Peso: 3,5 & 15 kg	C. carpio	acetona	9	IM	0,4	3,6	--	--	12	130-150	Lam, 1982
Paralichthys dentatus	7	"	congelada	15	IM	11	11	--	--	72	49	"

Tabla 21: Ensayos de inducción de la ovulación en distintas especies.

machos al no poder canular el ovario. El uso de laparotomías exploratorias soluciona en esos casos el problema ya que permite reconocer las gónadas.

b) Acción hormonal en los machos:

Es de común aceptación que la inducción de la espermiación no es problemática, en general es espontánea y solo en los casos en que el semen emitido es viscoso o bien en las prácticas de acuicultura, donde se desea sincronizar la emisión de gametas, se procede a inducir hormonalmente la espermiación (Lam, 1982, Donaldson, y Hunter, 1983). El caso de H.m.malabaricus parece ser diferente, sus testículos, como hemos observado, no manifiestan cambios de volumen estacionales ni relacionados con la maduración. Su tamaño reducido hace suponer que el volumen de esperma emitido tiene que ser escaso; efectivamente, ejemplares recolectados que ocasionalmente esperman nunca emiten más que una o dos gotas de semen (Azevedo y Gomes, 1942; Pinto Paiva, 1972) y los ejemplares hasta el momento utilizados para fertilizar en forma artificial siempre han tenido que ser sacrificados y macerados sus testículos (Azevedo y Gomes, 1942). Este hecho, nada ventajoso, es de difícil resolución pues a pesar de los variados intentos aún no se ha obtenido espermiación inducida.

El análisis del efecto de distintas hormonas sobre el tejido espermatogénico de H.m.malabaricus y los ensayos con hipófisis homóloga brindan algunos resultados preliminares. Entre las distintas hormonas ensayadas solo los macerados de hipófisis homóloga, que involucran varias hormo-

nas en forma conjunta y la testosterona parecen tener actividad sobre el testículo. En ambas se observa una disminución de la cantidad de SPZ en los lóbulos espermáticos que en sucesivos ensayos se comprobó como un traslado al ducto deferente (tabla 22). Este efecto se comprobó relacionado a la 11 oxotestosterona en Salmo gairdneri (Billard et al, 1978) a la vez que en otras especies la testosterona y la 11 ketotestosterona estimulan la espermiación (Fostier et al, 1983).

El suministro de preparaciones de hipófisis y gonadotrofinas en distinto grado de purificación se ha empleado en forma común para inducir espermiación, como en Esox lucius (Billard y Marcel, 1980) y en otras especies (Donaldson y Hunter, 1983). Intentando reproducir los incrementos en el nivel de gonadotrofina que se observa relacionado naturalmente con la espermiación (Billard et al, 1975; Fostier et al, 1982, 1983; Dye et al, 1986; Kobayashi et al, 1986).

Tanto el traslado de los SPZ al ducto deferente como la espermiación en sí se han relacionado con la hidratación del plasma seminal (Clemens y Grant, 1964; Clemens et al, 1964). Este proceso se encuentra bajo control hipofisario, aparentemente mediado por gonadotrofinas (Clemens et al, 1964) y es inducible por GCH en Carassius auratus (Kobayashi et al, 1986). En H.m.malabaricus el ensayo efectuado con hipófisis homóloga **esta inconcluso, observándose un nivel escaso de hidratación a las 24 hs de inducido, y no habiéndose efectuado ensayos a tiempos mayores.**

El análisis conjunto de los distintos en-

CONTROLES	TRATADOS (DOSIS H/Kg)					
	2,25	5,25	9,75	15,75	9,5	
0	2,25	5,25	9,75	15,75		ESQUEMA 1
0		9,5		9,5	9,5	ESQUEMA 3
0	18	24	30	36	48	Horas de tratamiento
RESPUESTA:						
-	/	/	/	/	/	Area ocupada por SPZ
-	/ (+1)	/ (-1)	// (-2)	// (-2)	-	Diferencia de SPZ entre MI-MF, LOBULOS
-	/ (-1)	// (-2)	// (-2)	/// (-3)	-	Diferencia de SPZ entre NI-MF, EPERMITES
1	1-2	2	2-0	0	-	Estado DEFERENTE
0	-	0.3	-	0,6	0,6	Diferencia LIGADO-LIBRE en los LOBULOS
0	-	1	-	1,3	1	Diferencia LIGADO-LIBRE en los DEFERENTES
1	-	0-2	-	1	1-0	Estado DEFERENTE LIBRE
	?	ESCASA	?	?	?	HIDRATAACION
NO	NO	NO	NO	NO	NO	ESFERMIACION POR MASAJE ABDOMINAL
SIN CAMBIOS	LOS SPZ SE MOVILIZAN AL DUCTO DEFERENTE		ESPERMIACION			

Tabla 22: Integración de los ensayos sobre inducción de la espermiación con hipófisis homóloga.

sayos efectuados con hipófisis homóloga (tabla 22) permite observar, en forma preliminar, que el efecto hormonal a las 30 horas de iniciada la inducción (dosis de 9,5-9,75 H/kg) incide en una movilización de los SPZ de los lóbulos y los eferentes al ducto deferente, originando la disminución de SPZ computada así como el aumento de los mismos en el deferente. Entre las 30 y 48 hs de inducido se observa que la evacuación de los lóbulos y eferentes se acentúa y que los deferentes se encuentran evacuados o con menor cantidad de SPZ que anteriormente. Esta fase de posible espermiación no se detecta externamente y las causas son dudosas: podría existir una espermiación espontánea o bien inducida como respuesta al estrés de manipulación y cautiverio y por lo tanto no se obtendría semen por presión abdominal suave. Cabe destacar que parte del mecanismo de regulación podría verificarse por medio del sistema nervioso, acorde con observaciones de abundantes terminales nerviosas en contacto con músculo liso peritubular en distintas especies (Gresik, 1973 RUBY y Mc Millan, 1975; Aoki y Gutiérrez, 1978; Gardiner, 1978; Arriaga, 1981) o células mioides (Arriaga, 1981), y que podrían estar relacionadas con el estímulo de masaje suave.

La motilidad de los SPZ de H.m.malabaricus es indudablemente elevada (20-40m') en comparación con lo observado para otras especies (Stoss, 1983, Maggese et al, 1984). Esta cualidad podría compensar la escasa cantidad de semen emitida.

Las primeras observaciones sobre envejecimiento de los SPZ evidencian que hay una reducción, cohe-

rente en los dos niveles estudiados: motilidad (en tiempo y porcentaje) y capacidad fecundante. Esta reducción obedecería tanto al almacenado intratesticular luego de la inducción hormonal como al mantenimiento en refrigeración luego de extirpados los testículos. La incidencia de estas condiciones se verifica en una baja del 50% en ambas características.

c) Acción hormonal en las hembras:

El medio de cultivo utilizado para los folículos ováricos de H.m.malabaricus ha permitido efectuar ensayos sobre la acción hormonal in vitro durante las primeras 24 hs. Los resultados de incubaciones por 48 hs no son tan confiables ya que se han registrado porcentajes relativamente elevados de ovocitos deteriorados. Esta característica se podría relacionar con el pH del medio que debido a la escasa capacidad buffer del medio no ha podido ser ajustado, ya que la presión osmótica, otro factor importante (Jalabert et al, 1973; Goetz y Nagahama, 1985; Berndtson y Goetz, 1986) fue ajustada a los valores del plasma de la especie. Cabe destacar que el pH juega un importante rol en el efecto hormonal, actuando sobre la dosis media necesaria para obtener maduración final con Gth en truchas (Jalabert, 1976; Goetz y Nagahama, 1985).

En H.m.malabaricus se ha logrado inducir la maduración final in vitro por medio de la 17α 20 β DHP, Prog y DOC coincidiendo con los resultados obtenidos en: Salmo (Jalabert et al, 1972, 1973), Carassius, Essox (Jala-

bert, 1976), Cryzias (Hirose y Donaldson, 1972), PlecoGLOSSUS, Anchorhynchus y Carassius (Nagahama et al, 1983), Salvelinus y Perca (Theofan y Goetz, 1983), salvando las diferencias que existen entre las concentraciones efectivas y las potencias relativas en cada una de las especies.

La disociación que se obtiene in vitro entre la maduración final y la ovulación es conocida y la causa se encontraría en los diferentes mediadores hormonales que actúan (Jalabert, 1976) si bien se postula que altos niveles de 17α 20β DHP influirían sobre la ovulación (Van der Kraak et al, 1985).

La ovulación in vivo se desarrolla, normalmente, a continuación de la maduración final (Jalabert, 1976; Goetz, 1983) separandola sólo en el caso de sistemas experimentales especiales (Goetz y Nagahama, 1985). En H.m. malabaricus la Prog y la DOC, activas en la maduración final in vitro, produjeron el mismo efecto in vivo pero los ovocitos no continúan el proceso hasta llegar a la ovulación. La explicación de este comportamiento particular no es sencilla ya que las concentraciones hormonales utilizadas podrían ser insuficientes para superar un umbral determinado o alguna característica fisiológica particular de los folículos ováricos. Ese mismo cuadro se encontró en algunos ensayos efectuados con hipófisis homóloga y fue superado modificando la modalidad del suministro hormonal.

Las hormonas ensayadas sobre H.m. malabaricus presentaron diversa actividad:

- Las gonadotrofinas: los macerados de hipófisis homóloga poseen actividad inductora de la maduración final y de

la ovulación in vivo pero esa actividad aún no se ha demostrado in vitro. Esto se podría deber a que los extractos no fueron activos, si bien se siguieron las técnicas de extracción habituales (Donaldson et al, 1972). Otra posibilidad es que la actividad in vivo se deba no solo al suministro de Gth sino a las otras hormonas hipofisarias. Esta suposición podría ser apoyada en los modelos de regulación de la maduración final postulados para teleósteos en los que se incluye la acción de la interrenal, ya sea regulada por Gth o bien por ACTH (Sundararaj y Goswami, 1977; Goetz, 1983).

La GCH no parece ser activa in vitro ni in vivo en H.m.malabaricus contrariamente a lo observado en varias especies (Goetz, 1983; Donaldson y Hunter, 1983). Es probable que esta hormona humana no sea compatible con los receptores para Gth de esta especie; al respecto se ha observado que las hormonas de mamíferos son, en algunos bioensayos, entre 2 y 28 veces menos activas que las de teleósteos (Bonna Gallo y Licht, 1983) requiriendo en algunos casos concentraciones muy elevadas para inducir la maduración final (Donaldson y Hunter, 1983).

- Esteroides: se han elegido los que más frecuentemente presentan actividad de maduración (Goetz, 1983; Donaldson y Hunter, 1983) comprobándose que son activos in vitro e in vivo en Hoplias m. malabaricus. La mayor eficiencia relativa se ha obtenido in vitro con $17\alpha 20\beta$ DHP acorde a lo observado en la generalidad de las especies, en las cuales se postula como el mediador que actúa directamente sobre el ovocito (Jalabert, et al, 1973; Jalabert, 1976; Fostier et al, 1983; Goetz, 1983; Nagahama et al, 1983; Theofan y Goetz, 1983; Van der

Kraak et al, 1985; Van der Kraak y Donaldson, 1986; Dye et al, 1986).

La Progesterona es metabolizada naturalmente produciendo varios derivados entre los que se encuentra la $17\alpha 20\beta$ DHP (Theofan y Goetz, 1983). La Desoxicorticosterona se postula también como un derivado de la progesterona y por lo tanto dentro de la misma vía metabólica (Theofan y Goetz sintetizada en el ovario (Colombo et al, 1973; Tessone y Charreau, 1980; Theofan y Goetz, 1983) o en la interrenal (Sundararaj y Goswami, 1977). Su actividad se debería a la liberación de $17\alpha 20\beta$ DHP de las proteínas que actúan como transportadoras en la sangre (Goetz, 1983) o bien actuar directamente sobre la maduración final como en el caso de Heteropneustes fossilis y Brachidario perio (Sundararaj y Goswami, 1977; Van Ree et al, 1977).

- Antiestrógenos: los estrógenos tienen una acción indirecta sobre la regulación de la maduración, bajando las concentraciones de Gth hipofisarias. Los antiestrógenos suprimen este efecto negativo (Goetz, 1983). En H.m.malabaricus aún no se ha demostrado la efectividad del Citrato de Clomifene; sin embargo es muy positivo el indicio de mantener el Índice de Maduración constante durante cuatro días ya que se ha observado que este decae rápidamente si no se suministran las hormonas adecuadas.

d) Inducción con Hipófisis:

Algunas especies responden a una sola dosis de hormona (tabla 21), no obstante, se conoce que el suministro en forma fraccionada resulta más efectivo que una

sola dosis masiva (tabla 2). En nuestro trabajo hemos utilizado la técnica de hipofisación en dosis graduales en base a los resultados exitosos obtenidos en la misma especie (tabla 2; Azevedo y Gome 1943; Godoy, 1975) y por el hecho de que es un método progresivo que prepara al folículo ovárico para la maduración final (Goetz, 1983). En H.m.malabaricus el aumento gradual de la dosis, incrementó la maduración ovocitaria, sin embargo, si bien en casi todos los casos se produjo la ruptura de la vesícula germinal, la ovulación solo se logró suministrando pequeñas dosis durante períodos cortos (4 á 6 hs), o bien usando dosis elevadas aplicadas con un intervalo de 12 hs. Interpretamos el resultado en función de la necesidad de un umbral de hormona circulante para que se desencadene la ovulación. Es probable que en los otros ensayos los niveles hormonales no puedan alcanzar los umbrales adecuados como resultado del propio metabolismo de las hormonas. Al respecto, en trucha 3 hs después de la inculación hipofisaria el nivel de hormona circulante desciende y es preciso mantenerlo con otras inyecciones (Fostier et al, '83).

El método H3 presenta menor varianza en el TRVG, en el tiempo de latencia y en el TMAD, además requiere la menor cantidad de hipófisis por peso y el menor número de inyecciones, obteniéndose desoves de magnitudes comparables a los otros dos métodos. Por estas causas parece ser el método más adecuado. El suministro de hipófisis en dos dosis es dentro de los métodos graduales el más común de los utilizados para teleosteos (Lam, 1982) y es útil en H.m.malabaricus.

El análisis de los distintos parámetros medidos durante la inducción hormonal expresa que existe

relación entre el diámetro de los ovocitos y la ovulación de acuerdo a lo que ya se conocía (Goetz y Theofan, 1979; Wallace y Selman, 1980). En cambio, no se ha encontrado la relación, que estos mismos autores expresan, entre la posición de la vesícula germinal y la ovulación, ya que los ejemplares con VG lateralizadas o subperiféricas responden bien a la inducción.

Un parámetro importante es la composición del ovario, ya que si presenta más de un 18% de ovocitos aún vitelogénicos o más de un 5% de ovocitos en atresia, no responde a la acción hormonal. Esta falta de respuesta puede atribuirse a la ausencia de receptores hormonales, que todavía no se han desarrollado (Goetz, 1983), o a alguna interferencia hormonal ya que tanto durante la vitelogénesis, como durante la regresión, se presentan condiciones hormonales adversas a la maduración final (Van der Kraak, 1983; Goetz, 1983).

El normal desarrollo de los desoves no parece estar condicionado por ninguna de las características estudiadas ya que se ha observado que sólo los ovocitos logrados en los extremos de estos parámetros presentan mayor probabilidad de ser defectuosos; esto se comprueba en ovarios con un 17% de OVI, 5% de atrésicos y en desoves de menos de 10 g.

Cabe destacar que el TRVG representa un buen parámetro para controlar la normal evolución de la inducción.

Se ha observado la presencia de hidratación y precipitados protéicos en el líquido ovárico, lo que se relacionaría con una evolución anormal en casos de presentarse en exceso.

Una característica que debe ser tenida en cuenta es la calidad de las hipófisis inyectadas,

no siendo conveniente usar hipófisis conservadas de un año a otro (Harvey y Hoar, 1979) a menos que se extremen las medidas de almacenaje (Donaldson et al, 1978; Donaldson y Hunter, 1983).

Consideramos conveniente señalar que en H.m.malabaricus hemos logrado ovulaciones usando concentraciones hipofisarias aproximadamente cuatro veces mayores que las utilizadas en Brasil para producir ovulaciones en la misma especie; es probable que esta diferencia se relacione con la distinta fase de maduración de los ejemplares respectivamente utilizados en cada caso (tabla 2; Azevedo Y Gomes, 1943; Godoy, 1975). Otro elemento que puede modificar los resultados incluso para una misma especie de diferentes localidades (Lam, 1982), es la distinta actividad de las hipófisis utilizadas, debido a los múltiples factores que las afectan; por otra parte, la comparación es dificultosa debido a que no existe aún un bioensayo "standard" que indique su potencia como inductora (Lam, 1982).

El decrecimiento del estado de maduración, demostrado por la regresión de la vesícula germinal que vuelve hacia el centro del ovocito, observado en H.m.malabaricus, puede revertirse por estimulación hormonal, lo que sugiere que la migración de la vesícula germinal se encontraría bajo control hormonal. Poco se sabe del mecanismo de este desplazamiento, por lo menos en teleósteos; sólo ha podido constatararse que el estrés ocasionado tanto por el transporte como por el manipuleo del ejemplar alteran el metabolismo iónico (Aldrin et al, 1980). Por otra parte, este estrés

provocaría sobre los ovocitos un efecto atrésico por lo que se recomienda iniciar la estimulación hormonal inmediata mente luego del transporte (De Montalembert et al, 1978; Lam, 1982).

Cabe señalar que dejando en aclimatación peces capturados, los ovocitos en maduración, en general se atresian completamente. Utilizando los ovocitos de ejemplares de H.m.malabaricus recién sometidos a estres hemos logrado, en tiempo relativamente breve, que se reanude, con todas las manifestaciones del caso, la maduración de los mismos por medio del suministro de hormona hipofisaria; esta observación permite emitir la hipótesis que las alteraciones provocadas por estres por breve tiempo, serían reversibles.

IV. CONCLUSIONES GENERALES

- Los testículos de H. m. malabaricus son de tipo "lobular, de espermatogonias no restringidas", comparables al común de los teleósteos.
- Se han reconocido los distintos elementos celulares testiculares frecuentemente descritos y, además, unas células peculiares de la túnica albugínea, que hemos denominado "células especiales" (ya que presentan granulos de colesterol) y que no reconocen homologías con otros grupos celulares descritos en teleósteos.
- Los conductos eferentes se encuentran parcialmente colonizados por células germinales, limitándose éstas a la faz ventral.
- La dinámica de la espermatogénesis es cíclica, reconociéndose cuatro periodos:
 - a) Período reproductivo: con espermatogénesis y espermiogénesis activas, hipertrofia e hiperplasia de las células de Leydig. Se extiende desde fines de octubre a principios de febrero.
 - b) Período de reparación: parte de los espermatocitos y de las espermatidas se atresian y parte prosiguen su desarrollo diferenciándose en espermatozoides. Al finalizar este proceso sólo permanecen espermatogonias A y B y espermatozoides. Las células de Leydig decrecen en número y volumen. Se extiende entre fines de febrero y marzo.
 - c) Período de proliferación: las espermatogonias C se forman por mitosis. Tanto las espermatogonias A como las B podrían representar las células basales postulándose dos modelos alternativos que explicarían la renovación. Durante

este período se registra también hipertrofia e hiperplasia en las células de Leydig. Se extiende desde abril/mayo a septiembre.

d) Período de preparación: se inicia la meiosis, activándose la espermatogénesis; octubre-noviembre.

- El testículo de esta especie no evidencia un mecanismo de degradación de los espermatozoides remanentes; en efecto, se acumulan hasta que, antes de iniciarse una nueva espermiogénesis, son eliminados.

- La marcada actividad cíclica, sin embargo, no se refleja en variaciones de volumen, peso o Índice Gonadosomático (IGS), constituyendo esto una característica poco común entre los teleosteos.

- Los ovarios de H. m. malabaricus poseen ovocitos que pueden ser clasificados en nueve estadios, según las distintas fases de maduración: a) Ovogonias (OI), aisladas o formando nidos multicelulares; b) Ovocitos en crecimiento primario (OII), con cromosomas plumulados, evidencias de acumulación de ARN y proteínas citoplasmáticas y formación del núcleo vitelino; c) Ovocitos (OIII) en los que se forman los alvéolos corticales; d) OIV, OV y OVI que corresponden a distintos grados de la vitelogené-
sis; e) OVII en los que se evidencian las distintas fases de la migración de la vesícula germinal como parte de la maduración final; f) OVIII en los que se verifica la ruptura de la vesícula germinal; g) OIX que corresponden al ovocito ovulado.

- La membrana del ovocito presenta una "zona radiata" típica y según nuestras observaciones también una "zona externa", gli coproteica, que sufre cambios luego de la ovulación ocluyendo los poros canales. Esta capa externa podría considerarse como

la responsable de la adhesión entre los ovocitos que es característica del desove de esta especie.

- Los ovarios presentan cambios de volumen, peso e IGS en función de una actividad cíclica. En base a las variaciones celulares hemos considerado oportuno dividir el año en cuatro períodos: 1) Mayo-Julio: Crecimiento primario y formación de los alvéolos corticales.

2) Julio-Septiembre: vitelogénesis, con una etapa más activa en Septiembre-Octubre.

3) Noviembre-Febrero: Maduración Final.

4) Marzo-Mayo: reparción.

- La diversidad de IGS que se encuentra en un mismo período evidencia una gran asincronía poblacional que permite encontrar ovarios en distintos estadios de maduración.

- A medida que aumenta el IGS se nota la maduración de los ovarios, caracterizada por ovocitos cada vez de mayor tamaño y de estadios más avanzados. Además con el aumento de peso varía también la sección transversal de los ovarios, que de triangular se torna circular. La presencia de ovocitos avanzados en conjunto con atresias y folículos desovados en ovarios de IGS entre 3 y 5 indica desoves parciales, en cambio en ovarios con IGS 0,5-1,5 el desove es total.

- Los seis estadios de maduración ovarica consignados en este trabajo (Previtelogénesis, Vitelogénesis, Vitelogénesis activa, Maduración final, Semidesovado y Desovado, ver tabla 1) resumen las distintas fases ovocitarias, el IGS, la sección del ovario, y la coloración, según se manifiestan durante los cuatro períodos del año. En las poblaciones de las lagunas de Chascomús, el período que comprende el cuadro de Maduración final (Noviembre-

Febrero) resulta muy variado, encontrándose ovarios desde pre-
vitelogénesis hasta el desovado.

- La presencia de una cohorte de ovocitos de un determinado es-
tadio dominante, frente a otros estadios ovocitarios, caracteriza
a los ovarios de H. m. malabaricus como "Síncronos por grupos".
El reclutamiento de esa cohorte se efectuaría desde los OV; que
durante el ciclo mantienen un lapso de discontinuidad. Se ha po-
dido comprobar el reemplazo de ese estadio por OVI y OVII confor-
me aumenta el IGS.

- La hipófisis de H. m. malabaricus es del tipo "leptobásico"
y presenta las tres zonas y los distintos tipos celulares que
habitualmente se describen para teleósteos.

- Las células basófilas (AB+, PAS+) de la PDP presentan varia-
ciones funcionales relacionadas con el ciclo reproductivo, sien-
do las probables células gonadótropas. Nuestras observaciones
han reconocido células basófilas densamente granuladas, escasa-
mente granuladas y cisternales que alternan numericamente duran-
te el ciclo, tanto en ejemplares machos como en hembras, siguien-
do un mismo patrón.

- Los ciclos reproductivos de ambos sexos coinciden durante los
períodos de "reproducción (machos)"/"maduración final (hembras)"
y de "reparación (ambos sexos)". Sin embargo cabe señalar que
los machos parecen responder más uniformemente que las hembras
a los factores ambientales; por otra parte las hembras requerirían
otro tipo de estímulos que desencadenen los procesos de vi-
telogénesis y de maduración final.

- El período de freza se encuentra dentro del caracterizado por
fotoperíodos largos (más de 14hs de luz), temperaturas medias
mayores de 17°C y precipitaciones mayores de 80mm mensuales

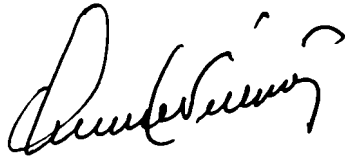
(Noviembre-Febrero).

- El período de reparación se sitúa durante la fase descendente del fotoperíodo y de la temperatura.
- La selección de reproductores de ambos sexos en H. m. malabaricus puede realizarse por medio de la combinación de la observación de la papila urogenital y de la canulación a través del orificio urogenital; estos métodos permiten reconocer las hembras maduras. El uso de laparotomías soluciona los casos de duda en la selección de machos.
- Se ha comprobado el efecto de la hipófisis homóloga y de la Testosterona sobre la espermiación de H.m.malabaricus. El suministro de 9,5-9,75 H/kg produce una baja en la cantidad de espermatozoides en el lumen lobular, evidenciándose en una primera fase su **traslado** al deferente (hasta las 30hs de iniciado el ensayo). En la segunda fase se observa una marcada evacuación tanto de los lóbulos seminíferos y los eferentes como del deferente (hasta 48hs). Sin embargo hasta el momento no se ha podido obtener semen en forma controlada.
- La motilidad de los espermatozoides es prolongada (20-40 m').
- Se ha registrado envejecimiento en los espermatozoides luego del mantenimiento en refrigeración de testículos inducidos hormonalmente, evidenciado por un descenso en la motilidad y una pérdida de la capacidad fecundante.
- Se ha logrado mantener in vitro fragmentos de ovario y ensayar sobre éstos el efecto de distintas hormonas. Se ha comprobado que la más efectiva en inducir la maduración final es la $17\alpha 20\beta$ DHP, **seguida** por la Progesterona y la Desoxicorticosterona. Tanto la Progesterona como la Desoxicorticosterona mantienen su efecto in vivo en las mismas proporciones relativas, sin em-

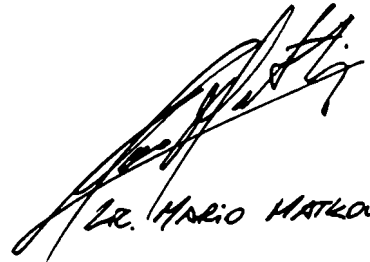
bargo no inducen la ovulación.

- La GCH, utilizada tanto in vitro como in vivo, se ha demostrado inactiva en machos y hembras de H.m.malabaricus.
- El antiestrogeno Citrato de Clomifene mantiene ~~la~~ vesícula germinal en una posición constante durante varios días, evidenciando actividad.
- Los macerados y extractos de hipófisis homóloga (extraídos de la pesca comercial) constituyen un medio adecuado para inducir la maduración final y la ovulación in vivo, si bien no se ha podido comprobar su actividad in vitro. El mejor resultado ha sido obtenido empleando dosis de 9 hipófisis/kg suministradas en dos inyecciones (3 y 6 H/kg respectivamente con un intervalo de 12 hs).
- Varios parámetros condicionan la respuesta a la inducción hormonal: entre éstos, el diámetro de los ovocitos debe ser mayor de 1,425mm, el ovario debe presentar menos del 18% de ovocitos VI y menos del 5% de ovocitos en atresia.
- La ubicación de la vesícula germinal a las 24 hs de iniciada la inducción, representa un control útil de la evolución; se ha comprobado que si el índice E es menor de 0,95 es poco probable que el ejemplar ovule.
- Si los ejemplares hembras capturados no son inyectados inmediatamente con hormona, la maduración del ovocito sufre un retroceso indicado, según las observaciones realizadas en ovocitos transparentados, por el desplazamiento (hacia el centro del ovocito) de la vesícula germinal. Luego de varios días de la captura el ovario se torna atresico. Por otra parte si el tratamiento hormonal se efectúa en un lapso relativamente breve (1-2 días) de la captura, se obtienen ovulaciones normales y eso coincide

con un desplazamiento, hacia la periferia del ovocito, de la vesícula germinal, demostrando que se ha revertido el proceso de desgaste inicialmente provocado por la captura.



DR. A. PISANÓ
DIRECTOR LABORATORIO
INVESTIGACIONES EMBIOLÓGICAS
(CONICET)



DR. MARIO MATKOVIC

V. BIBLIOGRAFIA

- AALSETH, E.P. y SAACKE, R.G. 1986. Vital Staining and Acrosomal Evaluation of Bovine Sperm. Gamete Research, 15:73-81.
- ABRAHAM, M.; RAHAMIN, E.; TIBIKA, H.; GOLENSER, E. y KIESELSTEIN, M. 1980. The Blood-testis barrier in Aphanius dispar (Teleostei). Cell. Tissue Res., 211:207-214.
- AHSAN, S.N. 1966. Cyclical Changes in the Testicular Activity of the Lake Chub Couesius plumbeus (Agassiz). Can. Jour. Zool., 44(2):149-159.
- AHSAN, S.N. 1966b. Effects of Temperature and Light on the Cyclical Changes in the Spermatogenetic Activity of the Lake Chub Couesius plumbeus (Agassiz). Can. Jour. Zool., 44(2):161-171.
- AL-DAHAM, N.K. y BHATTI, M.N. 1979. Annual Changes in the Ovarian Activity of the Freshwater Teleost Barbus luteus (Heckel) From Southern Iraq. J. Fish. Biol., 14:381-387.
- ALDRIN, J.F.; MESSENGER, J.L.; y MEVEL, M. 1980. Essai sur le stress du transport chez le saumon coho juvenile (Oncorhynchus kisutch). Aquaculture, 17:279-289.
- ANAND, T.C. y SUNDARARAJ, B.I. 1975. Response of the Pituitary of the Catfish, Heteropneustes fossilis (Bloch), to the bilateral ovariectomy. Acta. Anat., 93:141-150.
- ANDERSON, E. 1967. The Formation of the Primary Envelope During Oocyte Differentiation in Teleosts. J. Cell. Biol., 35:193-2
- ANDERSON, E. 1968. Cortical Alveoli Formation and Vitellogenesis Oocyte Differentiation in the Pipefish Syngnathus fuscus and the Killifish (Fundulus heteroclitus). J. Morphol., 125:23-60.

- AOKI, A y GUTIERREZ, M. 1978. Inervación eferente del tejido muscular liso peritubular en el testículo de Plecostomus cordovae. Rev. Microsc. Electr., 5:138-139.
- ARRIAGA, A. 1981. Estudio ultraestructural del ciclo reproductivo del testículo de Plecostomus cordovae. Tesis de Doctorado, FCEF y N, UNC.
- AZEVEDO, P de. y GOMES, A.L. 1942. Contribucao da biologia de traíra Hoplias malabarica (Bloch, 1794). Bol. Ind. Animal 5(4):15-64.
- BAILEY, R.E., 1957, The Effect of Estradiol on Serum Calcium, Phosphorus and Protein of Goldfish. J. Exp. Zool., 136: 455-469.
- BALL, J.N. y BAKER, B.I. 1969. The Pituitary Gland: Anatomy Histophysiology. En : Fish Physiology (Hoar, W.S.; Randall, D.J. eds.) Academic Press, 2:1-111.
- BARA, G. 1960. Histological and Cytological Changes in the Ovaries of Mackerel Scomber scomber, L. During the Annual Cycle. Istambul Univ. Fen. Fak. Mecm. Ser. B, 25:49-91.
- BARA, G. 1969. Histochemical Demonstration of 3β -, 3α -, 11β -, and 17β -Hydroxysteroid Dehydrogenases in the Testis of Fundulus heteroclitus. Gen. Comp. Endocrinol., 13:189-200.
- BARBIERI, M.C.; BARBIERI, G. y MARINS, M.A. 1981. Sobre la anatomía e histología del testículo de Geophagus brasiliensis (Quoy y Gaimard, 1824) na represa do Lobo, Estado de Sao Paulo. Rev. Bras. Biol., 41(1):169-173.
- BATTLE, M.I. 1940. The Embryology and Larval Development of the Gold Fish (Carassius auratus, L.) from Lake Erie. Ohio Jour. Sci., 40:82-93.

- BEAMS, H.W. y KESSEL, R.G. 1973. Oocyte Structure and Early Vitellogenesis in the Trout Salmo gairdneri. Am. J. Anat. 136:105-122.
- BELSARE, D.K. 1966. Development of the Gonads in Channa punctatus Bloch (Osteichthyes:Channidae). J. Morphol., 119:467-476.
- BERNDTSON, A.K. y GOETZ, F.W. 1986. Investigations on the Control of in vitro Spontaneous Brook Trout (Salvelinus fontinalis) Ovulation. Gen. Comp. Endocrinol., 61:134-141.
- BIENAFZ, K.; EPLER, P.; THUY, L.N. y KOGUT, E. 1979. Changes in the Ovaries of the Adult Carp. Aquaculture, 17:45-69.
- BILLARD, R. 1969. La spermatogenese de Poecilia reticulata. Estimation du nombre de générations spermatogoniales et rendement de la spermatogénese. Ann. Biol. Animale Biochim. Biophys. 9:251.
- BILLARD, R. 1976. Induction of Sperm Release in the Gold Fish by Some Steroids. IRCS, 4:42
- BILLARD, R. 1983. A Quantitative Analysis of Spermatogenesis in the Trout Salmo trutta fario. Cell. Tiss. Res., 230:495-502.
- BILLARD, R. 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. Reprod. Nutr. Dévelop, 26(4):877-920.**
- BILLARD, R. y MARCEL, J. 1980. Stimulation of Spermiation and Induction of Ovulation in pike (Esox lucius). Aquaculture, 21:181-195.
- BILLARD, R. y TAKASHIMA, F. 1983. Resorption of Spermatozoa in the Sperm Duct of Rainbow Trout During the Post Spawning Period. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 49(3):387-392.
- BILLARD, R.; JALABERT, B. y BRETON, B. 1972. Les cellules de Sertoli des poissons téléostéens. I. Etude ultrastructurale. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys., 12:19-32.

- BILLARD, R.; BRETON, B.; FOSTIER, A.; JALABERT, B y WEIL, C.
1978. Endocrine Control of the Teleost Reproductive cycle and its relation to External Factors: Salmonid and Cyprinid Models. In: Gaillard, P.J. y Boer, H.H. (Eds), Comparative Endocrinology. Elsevier/North Holland, Amsterdam;37-48.
- BILLARD, R; BRETON, B. y RICHARD, M. 1981a. On the inhibitory effect of some steroids on spermatogenesis in adult Rainbow Trout (Salmo gairdneri). Can.J. Zool.,59:1479-1487.
- BILLARD, R.; REINAUD, P. y LE BRENN, P..1981b. Effects of changes of Photoperiod on Gametogenesis in the Rainbow Trout (Salmo gairdneri). Reprod.Nutr.Dev.,21:1009-1014.
- BILLARD, R.; FOSTIER, A. ; WEIL, C. y BRETON, B. 1982. Endocrine control of spermatogenesis in Teleost Fish. Can.J.Fish.Aquat Sci.,39:65-79:
- BIN, MS.; LANGTON, A.; BIN, R.C. y TREVIÑO A.R. 1974. Comunicación previa sobre maduración sexual forzada con un nuevo método de preparación: suspensión de hipófisis a baja temperatura. Dir. Fauna y Flora, Prov Corrientes:87-94.
- BONETTO, A; DIONI, W. y PIGNALBERDI, C. 1969. Limnological Investigations on Biotic Communities in the Middle Paraná River Valley. Verh. International Verein. Limnol.,17:1035-1050.
- BONNA-GALLO, A y LICHT, P. 1983. Specificity to Gonadotropins in the Response of in vitro Estrogen Secretion by Fish Ovaries. Gen. Comp. Endocrinol., 51:316-319.
- BOWENS, A.B. y HOLLIDAY, F.G.T. 1961. Histological Changes in the Gonad Associated with the Reproductive Cycle of the Herring (Clupea harengus,L.). Mar.Res.Dep.Agric.Fish.Scotland.Nob.: 1-16.
- BULLOUGH, W.S. 1939. A Study of the Reproductive Cycle of the Minnow in Relation to the Environment. Proc.Zool.Soc. London 109:79-102.

- BUN NG, T. & IDLER, D.R. 1983. Yolk Formation and Differentiation in Teleost Fishes. En: Fish Physiology (Hoar, W.S.; Randall, D.J. y Donaldson, E.M., Eds) vol. 9 A, Academic Press:373-400.
- BURZAWA-GERARD, E. 1971. Purification d'une hormone gonadotrope hypophysaire de poisson téléostéen, la carpe, Cyprinus carpio L. Biochimie, 52:545-552.
- BURZAWA-GERARD, E. 1974. Etude biologique et biochimique de l'hormone gonadotrope d'un poisson téléostéen, la carpe (Cyprinus carpio L.). Mem. Mus. Natl. Hist. Nat., Ser. A (Paris), 86:1-77.
- BUSSON-MABILLOT, S. 1977. Un type particulier de secretion exocrine: celui de l'appareil adhesif de l'oeuf d'un poisson Téléostéen. Biol. Cellulaire, 30:233-244.
- CALVO, J.; MORRICONI, R. y LAGRECA, M. 1966. Estudios ictiológicos (desarrollo gonadal). En: Trabajos Técnicos, 2a. etapa (1966) Convenio Estudio Riqueza Ictícola. Ed. Dirección Recursos Pesqueros, La Plata (mimeo).
- CALVO, J.; LAGRECA, M.A. y MORRICONI, E.R. 1968. Desarrollo gonadal del pejerrey. En: Trabajos Técnicos, 4a. Etapa (1968) Convenio Estudio Riqueza Ictícola. Ed. Dirección Recursos Pesqueros, La Plata (mimeo).
- CARAMASCHI, E.R.; GODINHO, H.M. y FORESTI, F. 1982. Reproducao de Hoplias malabaricus (Bloch, 1794) (Teleostei, Erythrinidae) na represa de Rio Pardo (Botucatu, SP). I. Histologia e escala de maduracao do ovario. Rev. Brasil. Biol., 42(3):635-40
- CASTAGNOLI, N. y DONALDSON, E.M. 1981. Induced ovulation and rearing of the Pacu (Collosoma mitrei). Aquaculture, 25:275-279.
- CHACON, J. de O. 1975. Embryonic and Early Larval Stages of Cangaati Catfish Trachycorystes galeatus Linnaeus, 1756, of the Amanari Fish Culture Station, Maranguapé, Ceará, Brasil.

- Rev. Brasil. Biol., 35(4):737-744.
- CHANG, J.F. y PETER, R.E. 1982. Actions of Dopamine on Gonadotropin Release in Goldfish Carassius auratus. Proc.Int. Symp. Reprod. Physiol. Fish:51.
- CHANG, J. y PETER, R.E. 1983. Effects of Dopamine on Gonadotropin Release in Female Goldfish, Carassius auratus. Neuroendocrinology, 36:351-357.
- CHANG, J.P.; COOK, A.F. y PETER, R.E. 1983. Influence of catecholamines on Gonadotropin Secretion in Goldfish Carassius auratus. Gen. Comp. Endocrinol., 49:22-31.
- CHAUDHURI, H. 1976. Use of hormones in Induced Spawning of Carps J.Fish.Res.Board Can., 33:940-947.
- CHIEFFI, G. y BOTTE, H. 1964. Osservazioni sul significato funzionale della ghiandola annessa del testicolo del Blenidii. Bol. Zool., 31:471-477.
- CHRISTIANSEN, H.E. 1971. Descripción histológica del ciclo del ovario de merluza. Bol.Inst.Biol.Marina, 20:5-41.
- CLEMENS, H.P. y GRANT, F.B. 1964. Gonadal Hydration of Carp (Cyprinus carpio) and Goldfish (Carassius auratus) after injections of Pituitary extracts. Zoologica (NY), 49:193-210.
- CLEMENS, H.P.; CIERESZKO, L.S.; SHOEMAKER, J.D.; GRANT, F.B. 1964. Partial Characterization of the gonadal hydration principle in the Pituitaries of Carp (Cyprinus carpio) Gen.Comp. Endocrinol., 4:503-507.
- COLOMBO, L.; BERN, H.A.; PIEPRZYK, J. y JOHNSON, D.W. 1973. Biosynthesis of 11-desoxycorticosteroids by Teleost Ovaries and Discussion of their possible Role in Oocyte Maturation and Ovulation. Gen. Comp. Endocrinol., 21:168-178.
- COLMBO, L.; COLOMBO BELVEDERE, P. y ARCARESE, G. 1978. Gonadal

- Steroidogenesis and Gametogenesis in Teleost Fishes. A Study on the Sea Bass Dicentrarchus labrax.L. Boll.Zool,45:89-101.
- COOK, H. y Van OVERBEEKE, A.P. 1972. Ultrastructure of Pituitary Gland (Pars Distalis) in Sockeye Salmon (Oncorhynchus nerka) During Gonadal Maturation. Z. Zellforsch.,130:338-350.
- COUROT, M.; HOCHEREAU de REVIERS, M.T. y OTRAVANT, R. 1970. Spermatogenesis. En: The Testis (Johnson, A.D.; Gomes, W.R y Vandemark, N.L., Eds.) vol 1, cap 6. Academic Press.
- CUSSAC, V.E. 1988. Algunos aspectos de la biología de la reproducción de Rhamdia sapo (Valenciennes, 1840) Eigenmann y Eigenmann, 1888 (Pisces, Pimelodidae). Tesis de Doctorado, FCE y N, UBA.
- CUSSAC, V.E. y MAGGESE, M.C. 1986. Oogenesis in Rhamdia sapo (Pisces, Pimelodidae). Stages of the oocyte, egg's envelopes and effects of the human chorionic gonadotropin. Rev. Brasil. Biol., 46(1):139-147.
- CUSSAC, V.E. y MAGGESE, M.C. 1987. Seasonal Changes in the Presumptive Gonadotrophic Cells of the Catfish Rhamdia sapo (Pisces, Pimelodidae) in Relation to Gonadosomatic Index. Com. Biol. (Es. As.),6(2):113-123.
- DADONE, L. y NARBAITZ, R. 1967. Submicroscopic structure of Spermatozoa in Cyprinodontiform Teleost, Jenynsia lineata. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.,80:214-219.
- DE FELICE, D.A. y RASCH, E.M. 1969. Chronology of Spermatogenesis and Spermogenesis in Poeciliid Fishes. J.Exp.Zool, 171:191-208.
- DE LEEUW, R. 1985. Regulation of Gonadotropin Secretion in the African Catfish, Clarias gariepinus (Burchell). Tesis de Doctorado, Univ. Utrecht, Holanda.
- DE MONTALEMBERT, G.; JALABERT, B. y BRY, C. 1978. Precocius induc

- tion of Maturation and Ovulation in Northern Pike (Esox lucius). Ann.Biol.Anim.Biochim.Biophys., 18:969-975.
- DETLAFF, T.A. y SKOBLINA, M.N. 1969. The role of Germinal Vesicle in the Process of Oocyte Maturation in Anura and Acipenseridae. Ann.Embryol.Morphol,Suppl.1:133-151.
- De VLAMING, V.L. 1972a. Enviromental Control of Teleost Reproductive Cycles. A Brief Review. J.Fish. Biol., 4:131-140.
- De VLAMING, V.L. 1972b. The Effects of Temperature and Photoperiod on Reproductive Cycling in the Estuarine Gobiid Fish, Gillichthys mirabilis. Fish. Bull., 70:1137-1152.
- DROLLER, M.J. y ROTH, T.F. 1966. An Electron Microscope Study of Yolk Formation During Oogenesis in Lebistes reticulatus Guppyi. J.Cell.Biol., 28:209-232.
- DONALDSON, E.M. 1986. The integrated development and application of controlled reproduction techniques in Pacific salmonid aquaculture. Fish. Physiol. Biochem., 2(1-4):9-24.
- DONALDSON, E.M. y HUNTER, G.A. 1983. Induced Final Maturation, Ovulation and Spermiation in Cultured Fish. En: Fish Physiology (Hoar, W.S.; Randall, D.J. y Donaldson, E.M., Eds) Vol 9 B, Academic Press:351-403.
- DONALDSON, E.M. y YAMAZAKI, F. 1968. Preparation of Gonadotropin Hormone from Salmon (Onchorhynchus tsawitscha) Pituitary Glands. 51st. Annual Conf. Chem.Inst.Can.:64.
- DONALDSON, E.M.; YAMAZAKI, F.; DYE, H.M. y PHILLEO, W.W. 1972. Preparation of gonadotropin from Salmon (Onchorhynchus tsawitscha) Pituitary Glands. Gen. Comp.Endocrinol., 18:469-481.
- DONALDSON, E.M.; HUNTER, G.A. y DYE, H. 1978. Induced Ovulation in the Coho Salmon (Oncorhynchus kisutch) using Salmon Pituitary preparations, Gonadotropin Releasing Hormones and an antiestrogen. West.Reg.Conf.Gen.Comp.Edocrinol.; 24.
- DUMONT, J.N. y BRUMMETT, A.R. 1980. The Viteline Envelope, Chorion

- and Micropile of Fundulus heteroclitus Eggs. Gamete Res., 3: 25-44.
- DURAND, J.R. y LOUBENS, G. 1971. Developpement embrionaire et larvaire D'Alestes baremoze. Cah. ORSTOM ser Hydrobiol, 5(2): 137-145.
- DYE, H.M.; SUMPTER, J.P.; FAGERLUND, U.H.M. y DONALDSON, E.M. 1986. Changes in Reproductive Parameters During the Spawning Migrations of Pink Salmon, Oncorhynchus gorbuscha (Walbaum). J. Fish. Biol., 29:167-176.
- DYM, M. y FAWCETT, D.W. 1970. The Blood-Testis Barrier in the Rat and the Physiological Compartimentation of the Seminiferous Epithelium. Biol. Reprod., 3:308-326.
- ESPINACH ROS, A.; AMUTIO, V.G.; MESTRE ARCEREDILLO, J.P.; ORTI, G. y NANI, A. 1984a. Induced Breeding of the South American Catfish, Rhamdia sapo (C y V). Aquaculture, 37:141-146.
- ESPINACH ROS, A.; FORYUNY, A. y AMUTIO V.G. 1984b. Induced Breeding of the Sabalo, Prochilodus platensis Holmberg. Aquaculture, 41:385-388.
- FARBRIDGE, K.J.; BURKE, MG. y LEATHERLAND, J.F. 1985. Seasonal changes in the Structure of the Adenohypophysis of the Brown Bullhead (Ictalurus nebulosus, Lesueur). Cytobios, 44: 49-66.
- FREYRE, L. y TOGO, C. 1967. Piscicultura experimental. En: Trabajos Técnicos 3a. Etapa (1967). Convenio Estudio Riqueza Ictícola. La Plata (mimeo).
- FOLLENIUS, E. 1968. Cytologie et cytophysiologie des cellules interstitielles de l'Épinoche, Gasterosteus aculeatus L. Etude au Microscope Electronique. Gen. Comp. Endocrinol., 11:198-211.
- FOSTIER, A y BRETON, B. 1975. Binding of Steroids by Plasma of a Teleost: the Rainbow Trout Salmo gairdneri. J. Steroid. Biochem., 6:345-351.

- FOSTIER, A.; WEIL, C.; TERQUI, M.; BRETON, B. y JALABERT, B. 1978. Plasma Estradiol-17 β and Gonadotropin during Ovulation in Rainbow Trout (Salmo gairdneri, R). Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys., 18:929-936.
- FOSTIER, A.; BRETON, B.; JALABERT, B. y MARCUZZI, O. 1981. Evolution des niveaux plasmatiques de la gonadotropine glycoprotéique et de la 17 α hydroxy-20 β dihidroprogesterone au cours de la maturation et de l'ovulation chez la Truite Arc-en-ciel, Salmo gairdneri, C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., 293:817-20
- FOSTIER, A.; BILLARD, R.; BRETON, B.; LEGENDRE, M. y MARLOT, S. 1982. Plasma 11-Oxotestosterone and Gonadotropin during the Beginning of Spermiation in Rainbow Trout Salmo gairdneri, Gen. Comp. Endocrinol., 46:428-434.
- FOSTIER, A.; JALABERT, B.; BILLARD, R.; BRETON, B. y ZOHAR, Y. 1983. The gonadal Steroids. En: Fish Physiology (Hoar, W.S. Randall, D.J. y Donaldson, E.M., Eds.) vol 9 A, Academic Press:277-372.
- FOWLER, H.W. 1950. Os peixes de água doce do Brasil. Arq. Zool. Est. S. Paulo, 6(2):205-404.
- FUJINO, M.; YAMAZAKI, I.; KOBAYASHI, S.; FUKUDA, T.; SHINAGAWA, S. y NAKAYAMA, R.; WHITW, W.F. y RIPPEL, R.M. 1974. Some analogs of Luteinizing Hormone Releasing Hormone having intense ovulation-inducing activity. Biochem. Biophys. Res. Commun., 57:1248-1256.
- GABE, M. 1968. Techniques histologiques. Masson, Paris:1113pp.
- GARCIA ROMEU, F. 1964. Estudios histológicos e histoquímicos sobre el testículo de pejerrey Basilichthys bonariensis (Cuv. y Val.) Agro, 6(10):5-39.

- GARCIA ROMEU, F. y CORDERO FUNES, J.R. 1964. Variación estacional de la altura del epitelio de los conductos eferentes del testículo del pejerrey Basilichthys bonariensis (Cuv. y Val.). Agro, 6(10):44-48.
- GARDINER, D.M. 1978. The Origin and Fate of Spermatophores in the Viviparous Teleost Cymatogaster aggregata (Perciformes, Embiocetidae). J.Morphol., 155:157-172.
- GREENWOOD, P.H.; ROSEN, D.E.; WEITZMAN, S.H. y MYERS, G.S. 1966. Phyletic Studies of Teleostean Fishes, with a Provisional Clasificación of Living Forms. Bull. Amer. Mus. Nat. Hist., 131(4):340-544.
- GODINHO, H.M.; FERRI, S.; MEDEIROS, L.O. y BAKER, J.M.B. 1974. Morphological Changes in the Ovary of Pimelodus maculatus, Lecépede, 1803 (Pisces, Siluroidei) related to the reproductive cycle. Rev. Brasil. Biol., 34(4):581-588.
- GODOY, M.P. de. 1975. Peixes do Brasil; subordem Characoidei. Vol III:401-444.
- GOETZ, F.W. 1983. Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes. En: Fish Physiology (Hoar, W.S.; Randall, D.J. y Donaldson, E.M., Eds.) vol 9 B. Academic Press:117-170.
- GOETZ, F.W. y BERGMAN, H.L. 1978. The effects of steroids on final maturation and ovulation of oocytes from brook trout (Salvelinus fontinalis) and yellow perch (Perca flavescens). Biol. Reprod., 18:293-298.
- GOETZ, F.W. y MAGAHAMA, Y. 1985. Effects of pH on in vitro ovulation of Goldfish (Carassius auratus) Oocytes. J. Experimental Zoology, 235:81-85.
- GORBMAN, A. 1965. Endocrine Terminologic usage. Gen. Comp. Endocrinol., 5:129-130.

- GRESIK, E.W.; QUIRK, J.G. y HAMILTON, J.B. 1973, Fine Structure of the Sertoli Cells of the Testis of the Teleost Oryzias latipes (Cyprinodontiformes). Gen. Comp. Endocrinol., 21:341-352.
- GRESIK, E.W.; QUIRK, J.G. y HAMILTON, J.B. 1973. A Fine Structural and Histochemical Study of the Leydig Cells in the testis of the teleost Oryzias latipes (Cyprinodontiformes) Gen. Comp. Endocrinol., 20:86-98.
- GRIER, H.J. 1975. Ultrastructure of the Testis in the Teleost Poecilia latipinna. Spermiogenesis with Reference to the Intercentriolar Lamellated Body. J. Ultrastruct. Res., 45:82-92.
- GRIER, H.J. 1975. Aspects of Germinal Cyst and Sperm Development in Poecilia latipinna (Teleostei: Poeciliidae). J. Morphol. 146:229-250.
- GRIER, H.J. 1976. Sperm Development in the Teleost Oryzias latipes. Cell. Tiss. Res., 168:419-431.
- GRIER, H.J. 1981. Cellular Organization of the Testis and Spermatogenesis in fishes. Amer. Zool., 21:345-357.
- GRIER, H.J.; LINTON, J.R.; LEATHERLAND, J.F. y De VLAMING, V.L. 1980. Structural Evidence for Two Different Testicular Types in Teleost Fishes. Am. J. Anat., 159:331-345.
- GRIER, H.J.; FITZSIMONS, J.M. y LINTON, J.R. 1978. Structure and Ultrastructure of the Testes and Sperm Formation in Goodeid Teleosts. J. Morphol., 156:419-438.
- GUPTA, N.N. y YAMAMOTO, K. 1972. Electron Microscope Study on the Fine Structural Changes in the Oocytes of Gold Fish Carassius auratus During Yolk Formation Stage. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ., 22:187-206.

- GURAYA, S.S. 1979. Recent Advances in the Morphology, Cytochemistry and Function of Balbiani's Vitelline Body in Animal Oocytes. Int. Rev. Cytol., 59:249-321.
- GURAYA, S.S.; SAXENA, P.K. y GILL, M. 1976. Effect of Long Photo period on the Maturation of Ovary of the Catfish Mystus tengara (Ham). Acta Morphol. Neerl. Scand., 14:331-338.
- HALMI, N.S. 1952. Differentiation of Two Types of Basophils in the Adenohypophysis of the Rat and the Mouse. Stain Technology, 27(1):61-64.
- HARVEY, B.J. y HOAR, W.S. 1979. "The Theory and Practice of Induced Breeding in Fish". IDRC-TS21e Int. Dev. Res. Cent. Ottawa.
- HENSLEY, D.A. 1976. Collection of Post Larval and Juvenile Hoplias malabaricus (Characoidei, Erythrinidae) in Florida. Florida Scientist, 39(4):236-238.
- HENSLEY, D.A.; y MOODY, D.P. 1975. Occurrence and Possible Establishment of Hoplias malabaricus (Characoidei, Erythrinidae) in Florida. Florida Scientist, 38(2):122-128.
- HIROI, O. y YAMAMOTO, K. 1978. Studies on the Maturation of Salmonid Fishes. I. Changes in the Testis of the Chum Salmon, Oncorhynchus keta During Anadromous Migration. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ. 19(3):173-185.
- HIROSE, K. y DONALDSON, E.M. 1972. Biological Study on Ovation in vitro of Fish. III. The Induction of in vitro Ovation of Oryzias latipes Oocytes Using Salmon Pituitary Gonadotropin. Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries, 38(2):97-100.
- HIROSE, K. e ISHIDA, R. 1974. Induction of Ovation in the Ayu (Plecoglossus altivelis) with LH Releasing Hormone (LH-RH). Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 40:1235-1240.

- HOAR, W.S. 1969. Reproduction. En: Fish Physiology (Hoar, W.S. y Randall, D.J., eds.) Academic Press, 3:1-72.
- HOAR, W.S.; RANDALL, D.J. y DONALDSON, E.M. 1983. Fish Physiology. Vol 9(AyB) Academic Press. 477 pp.
- HOGENDOORN, H. y VISMANS, M.M. 1980. Controlles Propagation of the African Catfish, Clarias lazera (C y V). Aquaculture, 21:39-53.
- HOUSSAY, B.A. 1930. Acción sexual de la hipófisis en los peces y reptiles. Rev. Soc. Arg. Biol., 6:686-688.
- HOUSSAY, B.A. 1931. Action sexuelle de l'hypophyse sur les poissons et les reptiles. C.R. Sciences Soc. Biol.Ses. F.L., 106:377-378.
- HURLEY, D.A. y FISHER, K.C. 1966. The Structure and Development of the External Membrane in Young Eggs of the Brook Trout Salvelinus fontinalis (Mitchill). Can. J. Zoo., 44:173-190
- HYDER, M. 1970. Histological Studies on the Testes of Pond Specimens of Tilapia nigra (Günther) (Pisces, Cichlidae) and their Implications of the Pituitary-Testis Relationship. Gen. Comp. Endocrinol., 14:198-211.
- IWAMATSU, T. 1978. Studies on the Oocyte Maturation of the Medaka Oryzias latipes. VI. Relationship Between the Circadian Cycle of Oocyte Maturation and Activity of the Pituitary Gland . J. Exp. Zool., 206:355-364.
- IWAMATSU, T. 1980. Studies on the Oocyte maturation of the Medaka Oryzias latipes. VIII. Role of Follicular Constituents in Gonadotropin and Steroid Induced Maturation of Oocytes in vitro. J. Exp. Zool., 211:231-239.

- JALABERT, B. 1975. Modulation par differents steroïdes non maturants de l'efficacité de la 17α Hidroxy- 20β dihydro progestérone ou d'un extrait gonadotrope sur la maturation intrafolliculaire in vitro des oocytes de la truite arc-en-ciel Salmo gairdneri. C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., 281:811-814.
- JALABERT, B. 1976. In vitro Oocyte Maturation and Ovulation in Rainbow Trout (Salmo gairdneri), Northern Pike (Esox lucius), and Goldfish (Carassius auratus). J. Fish. Res. Board Can., 33:974-988.
- JALABERT, B.; BRETON, B. y BRY, C. 1972. Maturation et ovulation in vitro des oocytes de la Truite Arc-en Ciel Salmo gairdneri. C.R. Acad. Sc. Paris, t.275, série D: 1139-1142.
- JALABERT, B., BRY, C. SZOLLOSI, D. y FOSTIER, A. 1973. Etude comparée de l'action des hormones hypophysaires et stéroïdes sur la maturation in vitro des oocytes de la truite et du carassin (Poissona, Téléostéens). Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 13, hors-série :59-72.
- JALABERT, B.; BRETON, B. y BILLARD, R. 1974. Dosage biologique des hormones gonadotropes de poissons par le test maturation in vitro des ovocytes de truite. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 14(2):217-228.
- JOSHI, S.N. 1980. Histomorphology of the Testes of Labeo gonius. Bioreserch, 4(2):9-11.
- KHOO, K.H. 1979. The Histochemistry and Endocrine Control of Vitellogenesis in the Goldfish Ovary. Can. J. Zool., 57: 617-626.

- KOBAYASHI, W. y YAMAMOTO, T.S. 1981. Fine Structure of the micropilar Apparatus of the Chum Salmon (Onchorhynchus leeta) Egg, with a Discussion of the Mechanism for Blocking Polyspermy. J. Exp. Zool., 217(2):265-276.
- KOBAYASHI, M.; AIDA, K. y HANYU, I. 1985. Radioimmunoassay for Silver Carp Gonadotropin. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 51:1085-1091.
- KOBAYASHI, M.; AIDA, K. y HANYU, I. 1986. Gonadotropin Surge During Spawning in Male Goldfish. Gen Carp. Endocrinol., 70-79.
- KOBAYASHI, M.; AIDA, K. y HANYU, I. 1986. Effects of GCH and Milt Amount and Plasma Levels of Steroid Hormones in Male Goldfish. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 52(4):755.
- KUO, C.M.; y NASH, C.E. 1979. Annual Reproductive Cycle of Milkfish Chanos chanos Forskal, in Hawaiian Waters. Aquaculture, 16:247-251.
- KUO, C.M. y NASH, C.E. 1974. A procedural Guide to Induce Spawning in Grey Mullet (Mugil cephalus). Aquaculture, 3:1-14.
- LAALE, H.W. 1980. The Perivitelline Space and Egg Envelopes of Bony Fishes. A review. Copeia:210-226.
- LAM, T.J. 1982. Applications of Endocrinology to Fish Culture. Can. J. Aquat. Sci., 39:111-137.
- LAM, T.J. 1983. Environmental Influences on Gonadal Activity in Fish. En: Fish Physiology (Hoar, W.S.; Randall, D.J. y Donaldson, E.M., eds.) Vol. 9B. Academic Press. 65-116.
- LEATHERLAND, J.F. 1969. Studies on the Structure and Ultrastructure of the Intact and "Methallibure"¹treated Meso-

Adenohypophysis of the Viviparous Teleost Cymatogaster aggregata, Gibbons. Z. Zellforsch. 98:122-134.

LEATHERLAND, J.F. 1970. Seasonal Variation in the Structure and Ultrastructure of the Pituitary Gland in the Marine Form (Trachurus) of the Threespine Stickleback. II. Proximal Pars Distalis and Neuro Intermediate Lobe. Z. Zellforsch. 104:318-336.

LEATHERLAND, J.F. 1972. Hystophysiology and Innervation of the Pituitary Gland of the Goldfish, Carassius auratus, L.: A Light and Electron Microscope Investigation. Can. J. Zool., 50:835-844.

LONG, W.L. y BALLARD, W.W. 1976. Normal Embryonic Stages of the White Sucker, Catostomus commersoni. Copeia, 2:342-351.

LOCQUIN, M. y LANGERON, M. 1985. Manual de Microscopia. Labor. Barcelona. 373 pp.

LOFTS, B. y BERN, H.A. 1972. The Functional Morphology of the Steroidogenic Tissues. En: Steroids in non Mammalian Vertebrates (Idler, D.H., eds.) Academic Press, New York: 37-125.

LOPEZ, H.L.; MENNI, R.C. y MIGUELARENA, A.M. 1987. Lista de los peces de agua dulce de la Argentina. Biología Acuática, ILPLA, 12. 50 pp.

LOWE, R.M. 1964. The Fishes of the Rupunumi Savana District of British Guiana, South America, Part I. Ecology is

- Groupings of Fish Species and Effects of Seasonal Cycle on the Fish. J.Linn.Soc.Zool., 45:103-144.
- LCWE, R.M.; Mc CONNELL, R.H. 1975. Fish Communities in Tropical Freshwaters: Their Distribution, Ecology and Evolution "Longmans", Green New York.
- MAGGESE, M.C.; CUKIER, M. y CUSSAC, V.E. 1984. Morphological Changes ,Fertilizing Ability and Motility of Rhambdia sapo (pisces,Pimelodidae)Sperm Induced by Media of Different Salinities. Rev. Bras. Biol.,44(4):541-546.
- MATHEWS, S.A. 1983. The Seasonal Cycle in the Gonads of Fundulus. Biol. Bull., 74:66-74..
- MARCAILLOV,C.;SZOLLOSI, A 1980. The "Blood Testis" Barrier in a Nematode and a Fish : A Generalizable Concept. J. Ultrastruct. Res., 70:128-136.
- MARMORINO, C.; BOTTE, V; DELRIO, G. y CHIETTI, G. 1969. Le modificazioni delle cellule basofile dell'ipofisi di Serranus scriba , teleosteo ermafrodita sincrono nel corso del ciclo sessuale. Publ. Staz. Zool. Napoli.,37: 227-235.
- MARSHALL, S.J. y LOFTS, B. 1956. The Leydig-Cells Homologue in Certain Teleost Fishes. Nature,177:704-705.
- MARTOJA, R. y MARTOJA PIERSON, M. 1970. Técnicas de Histología animal, Toray Masson, Barcelona, 341 pp

- MARZA, V.D. 1938. Histophysiologie de l'ovogenese.
Hermann, Paris.
- MATKOVIC, M. y PISANÓ, A. 1985. Anatomía del desarrollo de la Tararira (Hoplias malabaricus)(Pisces, Erythrinidae). Res. IIas. Jornadas cinetíficas de la Sociedad de Biología de Córdoba, 10-11 de mayo, Córdoba, Argentina.
- MATKOVIC, M. y PISANÓ, A. 1986. Estudio de la organogénesis en Hoplias m. malabaricus (Pisces, Erythrinidae). REs. IIIas. Jornadas Científicas de la Sociedad de Biología de Córdoba, 22-23 de Mayo, Córdoba, R. Argentina:
- MATKOVIC, M. y PISANÓ, A. 1989a. Estudio macro y microscópico del desarrollo de Hoplias m. malabaricus (pisces, Erythrinidae). I: Fase Larval. Rev. Brasil. Biol., 49(2):000.
- MATKOVIC, M. y PISANÓ, A. 1989b. Estudio macro y microscópico del desarrollo de H. m. malabaricus (pisces, Erythrinidae) II. Fase larval. Rev. Brasil. Biol., 49(2):000-000.
- MATKOVIC, M.; CUSSAC, V.; CUCKIER, M.; GUERRERO, G.A. y MAGGESE, M.C. 1985. Desarrollo embrionario de Rhambdia sapo Valenciennes, 1840) Eigenmann y Eigenmann, 1888 (Pisces, Pimelodidae) I. Segmentación, Morfogénesis y organogénesis temprana. Rev. Bras. Biol. 45(112).
- MOREIRA, C. 1921. A piscicultura do Brasil. Rio de Janeiro: 2-13.
- MORRICONI, E.R. y CALVO, J. 1974. Citología de la adenohipófisis de sabalito (Pseudocurimata gilberti) (Osteichthyes, Tetragonoptéridae). Physis, 33(86):71-76.

- MUNKITTRICK, KR y LEATHERLAND, J.F. 1984. Seasonal Changes in the Pituitary-gonad axis of the Feral Goldfish Carassius auratus, L from Ontario, Canada. J.Fish. Biol., 24(1):75-90.
- NAGAHAMA, Y. 1983. The Functional Morphology of Teleost Gonads. En: Fish Physiology (Hoar, W.S.; Randall, D.J. y Donaldson, E.M., Eds.) vol. 9 A. Academic Press:223-276.
- NAGAHAMA, Y y ADACHI, S. 1985. Identification of maturation-inducing steroid in a teleost, the amago salmon (Oncorhynchus rhodurus). Devel. Biol., 109:428-435.
- NAGAHAMA, Y. y PETER, R.E. 1982. Effects of brain lesions on gonadotrop structure and serum gonadotropin levels in Goldfish. Cell. Tissue Res., 225:259-265.
- NAGAHAMA, Y; CHAN, K. y HOAR, W.S. 1976. Histochemistry and Ultrastructure of pre- and post-ovulatory follicles in the ovary of the Goldfish Carassius auratus. Can. J. Zool., 54:1128-1139
- NAGAHAMA, Y.; HIROSE, G.; YOUNG, S.; ADACHI, K.; SUZUKI, K. y TADAOKI, B. 1983. Relative in vitro Effectiveness of 17α 20β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one and other Pregnene Derivates on Germinal Vesicle Breakdown in Oocytes of Ayu (Plecoglossus altivelis), Amago Salmon (Oncorhynchus rhodurus), Rainbow Trout (Salmo gairdneri) and Goldfish (Carassius auratus). Gen. Comp. Endocrinol., 51:15-23.
- NAGAHAMA, Y; KAGAWA, H.; ADACHI, S.; y YOUNG, G. 1985. Stimulation of 17α 20β dihydroxy-4-pregnen-3-one production in the Granulosa Cells of Amago Salmon Oncorhynchus rhodurus, by cyclic nucleotides. J. Exp. Zool., 236:371-375.
- NAYYAR, S.K. y SUNDARARAJ, B.I. 1970. Seasonal Reproductive activity in the Testes and Seminal Vesicles of the Catfish Heteropneustes fossilis (Bloch). J.Morphol., 130:207-226.

- NAYYAR, S.K. y SUNDARARAJ, D.I. 1970. Response of the Seminal Vesicles of the Hypophysectomized Catfish Heteropneustes fossilis (Bloch) to Exogenous Androgens, Estrogen and Corticosteroid. J. Fish.Biol., 2:69-78.
- NICHOLS, T.J. y GRAHAM, G.P. 1972. The Ultrastructure of Lobule Boundary Cells and Leydig Cell Homologs in the Testis of a Cichlid Fish Cichlasoma nigrofasciatum. Gen. Comp. Endocrinol., 19:137-146.
- NOMURA, H. 1974. Symposium Acuaculture in Latin America, Montevideo, Uruguay, 26 Nov. - 2 Dec. '74. Roma, FAO, Carpas 6/74 Sc 28.
- O'HALLORAN, M.J. e IDLER, D.R. 1970. Identification and Distribution of the Leydig Cell Homolog in the Testis of Sexually Mature Atlantic Salmon (Salmo salar). Gen.Comp. Endocrinol., 15:361-364.
- OHTA, H. 1984. Electron Microscopic Study on Adhesive Material of Pacific Herring (Clupea pallasii) Eggs. Jpr. J. Ichthyol., 30 (4): 404-411.
- OLIVEREAU, M. 1963 a. Effect de la Radio Thyroïdectomie sur l'Hypophyse de l'Anguille. Discussion sur la Pars Distalis des Teleostéens. Gen. Comp. Endocrinol., 3:312-332.
- OLIVEREAU, M. 1963 b. Cytophysiology du Lobe Distal de l'Hypophyse des Agnathés et des poissons à l'Exclusion de Celle Concernant la Fonction Gonadotrope. In: Cytologie de l'Adenohypophyse (Benoit, J. y C. Da Lage, eds). C.N.R.S., Paris: 315-329.
- OLIVEREAU, M. 1967. Observations sur l'Hypophyse de l'Anguille Femelle, en Particulier Lors de la Maturation Sexuelle. Z.Zellforsch. Mikroskop. Anat., 80:286-306.

- OLIVEREAU, M. y RIDGEWAY, G.J. 1962. Cytologie Hypophysaire et Antigené Serique en Relation Avec la Maturation Sexuelle chez *Onchorhynchus* spp. Comp.Rend.Soc.Biol., 254:753-755.
- PANDEY, S. y HOAR, W.S. 1972. Induction of Ovulation in Goldfish by Clomifene Citrate. Can.J.Zool., 50:1679-1680.
- PARMA de CROUX, M.J. 1983 a. Nivel de Oxigeno Letal y Mínimo de Supervivencia de *Hoplias m. malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Erythrinidae). Iheringia, 63: 91-101.
- PARMA de CROUX, M.J. 1983 b. Metabolismo de Rutina de *Hoplias m. malabaricus* (Bloch, 1794) (Osteichthyes, Erythrinidae). Rvta.Bras.Zool., S. Paulo. 1(3):217-222.
- PARMENTIER, H.K.; Van den BOOGAART, J.G.M. y TIMMERMANS, L. . . P.M. 1985. Physiological Compartmentation in Gonadal Tissue of the Common Carp (*Cyprinus carpio*, L). A Study with Horseradish Peroxidase and Monoclonal Antibodies. Cell. Tissue Res., 242:74-81.
- PEARSE, A.G.E. 1985. Histochemistry Theoretical and applied. vol. 2 Analytical Technology. 4a. Ed. Churchill Livingstone, New York, 1055 pp.
- PETER, R.E. 1980. Serum Gonadotropin Levels in Mature Male Goldfish in Response to Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH-RH) and des-Gly¹⁰(D-Ala⁶) - LH-RH Ethylamide. Can.J.Zool., 58:1100-1109.
- PETER, R.E. 1981. Gonadotropin Secretion During Reproductive Cycles in Teleosts. Influences of a Environmental Factors. Gen. Comp. Endocrinol., 45:294-305.
- PETER, R.E. 1983. The Brain and Neurohormones in Teleost Reproduction. En: Fish Physiology (Hoar, W.S.; Randall, D.J. y Donaldson, E.M., Eds), vol. 9A Academic Press: 97-136.

- PEUTE, J.; de BRUYN, M.G.A.; SEDENRYK, R. y VAN OORDT, P.G. W.J. 1976. Cytophysiology and Innervation of Gonadotropic Cells in the Pituitary of the Black Molly (Poecilia latipinna). An Electron Microscopical Study. Cell.Tissue Res., 174:35-54.
- PEUTE, J.; de LEEUW, R.; GOOS, H.J.T. y VAN OORDT, P.G.W.J. 1984. Ultrastructure and Immunolabeling of Gonadotrops and Thyrotrops in the Pituitary of the African Catfish, Clarias lazera. Cell. Tissue Res., 238:95-103.
- PINTO PAIVA, M. 1972. Crescimento, Alimentacao e Reprodução da Traira Hoplias malabaricus (Bloch) no Nordeste Brasileiro. Imprensa Universitaria Federal de Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil: 32 pp.
- RAMIREZ, F. 1963 a. Observaciones Sobre la Reproducción de la Tararira. Period. Asuntos Agrarios, XI (120):7.
- RAMIREZ, F. 1963 b. Contribución al Conocimiento de la Tararira (Hoplias malabaricus malabaricus) de la Laguna de Chascomús (Prov. de Buenos Aires). Not.Mus. La Plata, XX (201):141-158.
- RINGUELET, R.A.; ARAMBURU, R.H. y ARAMBURU, A.A. 1967. Los Peces Argentinos de Agua Dulce. Comisión de Investigación Científica, Gobernación de la Prov. de Buenos Aires, La Plata, 602 pp.
- ROMER, A.S. 1966. Anatomía Comparada (Vertebrados). 4a. Ed. Interamericana, 435 pp.
- ROOSEN-RUNGE, E.C. 1977. The Process of Spermatogenesis in Animals. Cambridge Univ. Press.
- RUBY, S.M. y Mc MILLAN, D.B. 1975. The Interstitial Origin of Germinal Cells in the Testis of the Stickle Back. J.Morphol., 145:295-317.

- RUSSO, J. y PISANÓ, A. 1973. Some Ultrastructural Characteristics of Platypoecilus maculatus Spermatogenesis. Bull. Zool., 40:201-207.
- SAGE, M. y BERN, H.A. 1972. Cytophysiology of the Teleost Pituitary. Int. Rev. Cytol. 31:339-376.
- SCHMIDT, P.J. e IDLER, D.R. 1962. Steroid Hormones in the Plasma of Salmon at Various States of Maturation. Gen. Comp. Endocrinol., 2:204-214.
- SCHREIBMAN, M.P. 1964. Studies on the Pituitary Gland of Xipophorus maculatus (the Platyfish). Zoologica, 49:217-243.
- SCOTT, D.B.C. 1979. Environmental Timing and the Control of Reproduction in Teleost Fish. Symp. Zool. Soc. London, 44:105-132.
- SCOTT, D.B.C. y BAYNES, J.M. 1982. Plasma Levels of Sex Steroids in Relation to Ovulation and Spermiation in Rainbow Trout (Salmo gairdneri). Proc. Int. Symp. Reprod. Physiol. Fish.: 103-106.
- SELMAN, K. y WALLACE, R.A. 1986. Gametogenesis in Fundulus heteroclitus. Amer. Zool., 26:173-192.
- SELMAN, K.; BARR, V. y WALLACE, R.A. 1986. Oogenesis in Fundulus heteroclitus. IV. Yolk Vesicle Formation. J. Exp. Zool., 239:277-288.
- SHACKLEY, S.E. y KING, P.E. 1977. Oogenesis in a Marine Teleost Blennius pholis L. Cell. Tissue Res., 181:105-128.
- SHELTON, W.L. 1978. Fate of the Follicular Epithelium in Dorosoma petenense (Pisces, Clupeidae). Copeia, 2:237-244.
- SHESTA, T.K. y KHANNA, S.S. 1978. Seasonal Changes in the Testes of a Hill Stream Teleost, Garra gotyla (Gray). Acta Anat., 100:210-220.

- SIEGEL, S. 1979. Estadística no Paramétrica. Trillas, México.
- SINGH, A.K. y SINGH, T.P. 1976. Effect of Clomid, Sexovid and Prostaglandins on Induction of Ovulation and Gonadotropin Secretion in a Freshwater Catfish Heteropneustes fossilis (Bloch). Endokrinologie, 68:129-130.
- SNEED, K.E. y CLEMENS, H.P. 1963. The Morphology of Testes and Accessory Reproductive Glands of Catfishes (Ictaluridae). Copeia, 4:606-611.
- SOKAL, R.R. y ROHLF, F.J. 1979. Biometría. Principios y Métodos Estadísticos en la Investigación Biológica. Blume, 832 pp.
- SOKOL, H.W. 1961. Cytological changes in the Teleost Pituitary Gland Associated with the Reproductive Cycle. J.Morphol. 109:219-235.
- STACEY, N.E. y PETER, R.E. 1979. Central Action of Prostaglandins in Spawning Behavior of Female Goldfish. Physiol. Behav., 22:1191-1196.
- STACEY, N.E.; MC KENZIE, D.S.; MARCHANT, T.A.; KYLE, A.L. y PETER, R.E. 1984. Endocrine Changes During Natural Spawning in the White Sucker, Catostomus commersoni. I. Gonadotropin, Growth Hormone and Thyroid Hormones. Gen. Comp. Endocrinol., 56:333-348.
- STANLEY, H.P.; CHIEFFI, G. y BATTE, V. 1965. Histological and Histochemical Observations on the Testis of Gobius pagannellus. Z.Zellforsch.Mikrosk.Anat., 65:350-362.
- STOSS, J. 1983. Fish Gamete Preservation and Spermatozoan Physiology. En: Fish Physiology (Hoar, W.S.; Randall, D. J. y Donaldson, E.M., Eds.) vol. 9B, Academic Press:305-350.

- SUNDARARAJ, B.I. 1959. A Study of the Correlation Between the Structure of the Pituitary Gland of the Indian Catfish Heteropneustes and the Seasonal Changes in the Ovary. Acta Anat., 37:47-80.
- SUNDARARAJ, B.I. 1960. Correlation Between the Structure of the Pituitary and the Changes in the Testes of the Indian Catfish Heteropneustes. Acta Anat., 40:305-322.
- SUNDARARAJ, B.I. y GOSWAMI, S.V. 1966. Effects of Mammalian Hypophysial Hormones, Placental Gonadotropins, Gonadal Hormones and Adrenal Corticosteroids on Ovulation and Spawning in Hypophysectomized Catfish Heteropneustes fossilis (Bloch). J.Exp.Zool., 161:287-296.
- SUNDARARAJ, B.I. y S.V. GOSWAMI. 1977. Hormonal Regulation of in vivo and in vitro Oocyte Maturation in the Catfish, Heteropneustes fossilis (Bloch). Gen.Comp.Endocrinol., 32:17-28.
- SUNDARARAJ, B.I. y VASAL, S. 1976. Photoperiod and Temperature Control in the Regulation of Reproduction in the Female Catfish Heteropneustes fossilis. J.Fish.Res.Board Can. 33:959-973.
- SUNDARARAJ, B.I.; GOSWAMI, S.V. y VIRENDERJEET. 1978. Some Aspects of Ovum Maturation in Catfish. Abstr.Int.Cong. Hormo.Steroids., 5th 1978:95.
- SUNDARARAJ, B.I.; GOSWAMI, S.V. y LAMBA, V. 1979. Some Aspects of Oocyte Maturation in Catfish. J.Steroid.Biochem., 11:701-707.
- SUZUKI, K.; TAMAOKI, B. y HIROSE, K. 1981 a. In vitro Metabolism of 4-pregnenes in Ovaries of a Fresh Water Teleost the Ayu (Plecoglossus altivelis): Production of 17α - 20β

- Dihidroxi -4-Pregnen-3-One and its 5β reduced Metabolites, and Activation of 3β and 20β Hydroxysteroid Dehydrogenases by Treatment with a Fish Gonadotropin. Gen.Comp.Endocrinol., 45:473-481.
- SUZUKI, K.; NAGAHAMA, Y. y TAMAOKI, B. 1981 b. In vitro Synthesis of an Induced for Germinal Vesicle Breakdown of Fish Oocytes, $17\alpha 20\beta$ Dihidroxy -4-Pregnen-3-one by Ovarian Tissue Preparation of amago Salmon (Oncorhynchus rhodurus). Gen.Comp.Endocrinol., 45:533-535.
- SZÖLLÖSI, D. y JALABERT, B. 1974. La Theque de Follicule Ovaire de la Truite. J.Microsc.(Paris) 20:92-(abstr).
- TAKAHASHI, H. e IWASAKI, Y. 1973 a. The Occurrence of Histochemical Activity of 3β - Hydroxysteroid dehydrogenase in the Developing Testes of Poecilia reticulata. Dev. Growth.Differ., 15:241-253.
- TAKAHASHI, H. e IWASAKI, Y. 1973 b. Histochemical Demonstration of $\Delta 5-3\beta$ - Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity in the Testis of the Medaka Oryzias latipes. Endocrinol. Jpn. 20:529-534.
- TESORIERO, J.V. 1977. Formation of the Chorion (Zona Pellucida) in the Teleost Oryzias latipes. II. Polysaccharide Cytochemistry of Early Oogenesis. J.Histochem.Cytochem., 25:1376-1380.
- TESONE, M. y CHERREAU, E.H. 1980. Steroid Biosynthesis in the Gonads of the Teleost Fish Jenynsia lineata. Comp.Biochem.Physiol., B, 65B:631-637.
- THEOFAN, G. 1981. The in vitro Synthesis of Final Maturation Steroids by Ovaries of Brook Trout (Salvelinus fontinalis) and Yellow Perch (Perca flavescens). PhD Thesis. University of Notre Dame, Notre Dame, Indiana.

- THEOFAN, G. y GOETZ, F.W. 1983. The in vitro synthesis of Final Maturational Steroids by Ovaries of Brook Trout (Salvelinus fontinalis) and Yellow Perch (Perca flavescens). Gen.Comp.Endocrinol. 84-95.
- TOURY, R.J.; ANDRE, J. y CLEROT, C. 1977. Les Groupements Mitochondreaux des Cellules Germinales des Poissons Téléostéen Cyprinidés. IV. Analyse Biochimique des Constituants du Ciment Intermitochondrial Isolé. Biol. Cellulaire, 30:255-231.
- TROYER, H. 1980. Principles and Techniques of Histochemistry. Little Brown, 1s . Ed. 431 pp.
- ULRICH, E. 1969. Etude des Ultrastructures au Cours de l'Ovogenese d'un Poisson Téléostéen, le Danio Brachydanio rerio. J.Microsc.(Paris), 8:447-448.
- VAL-SELLA, M.V. y FAVA de MORAES, F. 1979 a. Cytology and Cytochemistry of the Hypophysis of the Freshwater Teleost Rhamdia hilarii (Val 1840). Gegenbaurs Morphol.Ib., 125: 161-173.
- VAL-SELLA, M.V. y FAVA de MORAES, F. 1979 b. Morphology of the Hypophysis of the Freshwater Teleost Rhamdia hilarii (Val, 1840). Anat.Anz., 145(2):146-154.
- VAL-SELLA, M.V. y SESSO, A. 1980 a. Thin Section and Freeze Fracture Studies of the Hypophyseal Proximal During Different Stages of the Reproductive Cycle. Cell. Tissue Res., 208:433-444.
- VAL-SELLA, M.V. y SESSO, A. 1980 b. Morphometric Evaluation of the Number of Gonadotropic Cells of the Teleost Rhamdia hilarii in the Maturation, Mature and Spent Stage of the Gonadal Cycle. Acta Zool. (stockh.) 61(3):133-140.

- VANDen HURK, R.; PEUTE, J. y VERMEIJ, J.A.J. 1978a. Morphological and Enzyme Cytochemical Aspects of the Testis and Vas Deferens of the Rainbow Trout Salmo gairdneri. Cell Tissue Res., 186:309-325.
- VAN den HURK, R.; VERMEIJ, J.A.J.; STEGENGA, J.; PEUTE, J. y VAN OORDT, P.G.W.J. 1978 b. Cyclic Changes in the Testis and Vas Deferens of the Rainbow Trout (Salmo gairdneri) with Special Reference to Sites of Steroidogenesis. Ann. Biol. Animl., Biochim., Biophys., 18:899-904.
- VAN DER KRAAK, G. 1983. An Introduction to Gonadotropin Receptor Studies in Fish. En: Fish Physiology (Hoar, W.S.; Randall, D.J. y Donaldson, E.M., Eds.) vol. 9A, Academic Press:405-442.
- VAN DER KRAAK, G.; DYE, H.M. ; E.M. DONALDSON y HUNTER, G.A. 1985. Plasma Gonadotropin, 17 Estradiol, and 17 α 20 β Dihydroxy-4-pregnen-3-one levels During Luteinizing Hormone Releasing Hormone Analogue and Gonadotropin Induced Ovation in Coho Salmon (Oncorhynchus kisutch). Can.J.Zool., 63:824-833.
- VAN DER KRAAK, G. y DONALDSON, E.M. 1986. Steroidogenic capacity of Coho Salmon Ovarian Follicles Throughout the Periovulatory Period. Fish Physiology Biochem., 1(4):179-186.
- VAN OORDT, P.G.W.J. y PEUTE, J. 1983. The Cellular Origin of Pituitary Gonadotropins in Teleosts. En: Fish Physiology (Hoar, W.S.; Randall, D.J. y Donaldson, E.M., Eds.) vol. 9A, Academic Press: 137-186.
- VAN REE, G.E.; LOK, D. y BOOSMAN, G. 1977. In vitro Induction of Nuclear Breakdown in Oocytes of the Zebrafish Brachidanio rerio (Ham.Buch). Effects of the Composition of the Medium and of Protein and Steroid Hormones. Proc.K.

Ned. Akad. Wetensch., C 80:353-371.

- VISWANATHAN, N. y SUNDARARAJ, B.I. 1974. Seasonal changes in the Hypotalamo-Hipofiseal-Ovarian System in the Catfish Heteropneustes fossilis (Bloch). J. Fish. Biol.,6:331-340.
- WALLACE, R.A. 1978. Oocyte Growth in non-mammalian Vertebrates. En: The Vertebrate Ovary (Jones, R.E., Ed.). Plenum (NY):469-502.
- WALLACE, R.A. y SELMAN, K. 1980. Oogenesis in Fundulus heteroclitus. II. The Transition from Vitellogenesis into Maturation. Gen. Comp. Endocrinol.,42:345-354.
- WALLACE, R.A. y SELMAN, K. 1981. Cellular and Dinamic Aspects of Oocyte Growth in Teleost. Am. Zool.,21:325-343.
- WIEBE, J.P. 1969. Steroid Dehydrogenases and Steroids in Gonads of the Seaperch Cymatogaster aggregata Gibbons. Gen. Comp. Endocrinol.,12:256-266.
- WEIL, C y CRIM, L.W. 1982. The Effects of Different Methods of administration of LH-RH Analogs on Spermiation in the Mature Landlock Salmon Salmo salar. Can. Soc. Zool. Bull,13(2):60 (abstr.)
- WEITZMAN, S.H. 1964 Osteology and Relationships of South American Characid Fishes of subfamilies Lebiasinidae and Erythrinidae with special reference to the subtribe Nannostominae. Proc. U.S. Nat. Mus.,116(3499):127-170.
- WILKINS, N.P. 1981. The Rationale and Relevance of Genetics in Aquaculture, an Overreview. Aquaculture,22:209-228.
- WOLF, K. y QUIMBY, M.C. 1969. Fish Cell and Tissue Culture. En: Fish Physiology (Hoar, W.S. y Randall, D.J., Eds.) vol 3. Academic Press;253-305.
- WUOURMS, J.P. 1976. Annual fish Oogenesis. I. Differentiation of the mature oocyte and formation of the Primary Envelope. Dev. Biol.,50:338-354.

- WUOURMS, J.P. y SHELDON, H. 1976. Annual Fish Oogenesis. II. For-
 mation of the Secondary Egg Envelope. Dev. Biol., 50:357-366.
- YAMAMOTO, M. 1964. Electron Microscopy of Fish Development. III.
 Changes in the Ultrastructure of the Nucleus and Cytoplasm
 of the Oocyte during its Development in Oryzias latipes.
J. Fac. Sci. Tokyo Univ., 10:335-346.
- YAMAMOTO, K.; OOTA, I.; TAKANO, K. e ISHIKAWA, T. 1965. Studies
 on the Maturing Process of the Rainbow Trout, Salmo gairdneri
irideus. 1. Maturation of the Ovary of a one Year Old Fish.
Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 31:123-132.
- YAMAZAKI, F. y DONALDSON, E.M. 1968. The Effects of Partially
 Purified Salmon Pituitary Gonadotropin on Spermatogenesis,
 Vitellogenesis and Ovulation in Hypofisectomized Goldfish
Carassius auratus. Gen. Comp. Endocrinol., 11:292-299.
- YAMAZAKI, F. y DONALDSON, E.M. 1969. Involvement of Gonadotropin
 and Steroid Hormones in the Spermiation of the Goldfish,
Carassius auratus. Gen. Comp. Endocrinol., 12:491-497.
- YARON, Z. 1966. Demonstration of 3β Hidroxy steroid dehidrogenase
 in the testis of Tilapia mossambica (Cichlidae, Teleostei).
J. Endocrinol., 34:127-128.
- YORKE, M.A. y McMILLAN, D.B. 1980. Structural Aspects of Ovulation
 in the Lamprey Petromyzon marinus. Biol. Reprod., 22:897-912.
- YOSHIOKA, H. 1966. On the Effects of Environmental Factors upon
 the Reproduction of Fishes. III. The occurrence and regula-
 tion of refractory period in the photoperiodic response of
 the medaka, Oryzias latipes. J. Hokkaido Univ. Educ., 17:
 23-33.
- YOUNG, G.; KAGAWA, H. y NAGAHAMA, Y. 1982. Oocyte Maturation in
 the amago Salmon (Onchorhynchus rhodurus). In vitro Effects

of Salmon Gonadotropin, Steroids and Cyanoketone (an Inhibitor of 3β hydroxi Δ 5-steroid Dehydrogenase). J. Exp. Zool., 224:265-275.

YOUNG, G.; CRIM, L.; KAGAWA, H.; KAMBEGAWA, A. y NAGAHAMA, Y.
1983. Plasma 17α 20β dihydroxy-4-pregnen-3-one levels During sexual Maturation of Amago Salmon (Oncorhynchus rhodurus): Correlation with plasma gonagotropin and in vitro production by ovarian follicles. Gen. Comp. Endocrinol., 51: 96-105.

PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS

Se ha publicado dos trabajos que condensan algunas de las observaciones de los capítulos de Ovogénesis y de Ensayos sobre la inducción de la maduración final, la ovulación y la espermiación:

- Oogenesis and Ovulation in normal conditions or induced by homologous hypophysis in Hoplias m. malabaricus (Pisces, Erythrinidae). Matkovic, M. y A. Pisanó. 1989. Rev. Brasil. Biol., 49(1):203-212.

- Final Maturation and Ovulation provoked by supply of Homologous Hypophysis in Hoplias m. malabaricus (Pisces, Erythrinidae). Matkovic, M. y A. Pisanó. 1989. Rev. Brasil. Biol., 49(1):213-220.

También, se encuentran en la fase final para su publicación:

- In vitro and in vivo action of inductory agents on Hoplias m. malabaricus final maturation (Pisces, Erythrinidae).

- Relationship between ovarian characteristics and ovulation induced with homologous hypophysis in Hoplias m. malabaricus (Pisces, Erythrinidae).

Han sido aceptados para su publicación las descripciones anatómicas e histológicas de la ontogenia de Tararira desde la eclosión hasta el estadio de juvenil. Estos trabajos han servido de guía para los controles de los ensayos efectuados para la tesis:

- Estudio macro y microscópico del desarrollo de Hoplias m. malabaricus (Pisces, Erythrinidae). I. Fase larval. Matkovic M. y A. Pisanó. 1989. Rev. Brasil. Biol., 49(2):000-000.

- Estudio macro y microscópico del desarrollo de Hoplias
m. malabaricus (Pisces, Erythrinidae). II. Fase postlarval.
Matkovic, M. y A. Pisanó. 1989. Rev. Brasil. Biol., 49(2):000-000.