

Tesis de Posgrado

Biología reproductiva de la anguila criolla *synbranchus marmoratus* Bloch 1745, (Teleostei : Synbranchidae) oogenesis e inducción hormonal de la maduración final y ovulación

Ravaglia, Mario Aldo

1999

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:

Ravaglia, Mario Aldo. (1999). Biología reproductiva de la anguila criolla *synbranchus marmoratus* Bloch 1745, (Teleostei : Synbranchidae) oogenesis e inducción hormonal de la maduración final y ovulación. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3239_Ravaglia.pdf

Cita tipo Chicago:

Ravaglia, Mario Aldo. "Biología reproductiva de la anguila criolla *synbranchus marmoratus* Bloch 1745, (Teleostei : Synbranchidae) oogenesis e inducción hormonal de la maduración final y ovulación". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3239_Ravaglia.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Laboratorio de Embriología Animal
Departamento de Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

BIOLOGIA REPRODUCTIVA DE LA ANGUILA CRIOLLA

Synbranchus marmoratus

BLOCH 1745, (TELEOSTEI: Synbranchidae)
OOGENESIS E INDUCCION HORMONAL
DE LA MADURACION FINAL Y OVULACION

autor: Mario Aldo Ravaglia
directora: Dra. Maria Cristina Maggese

Trabajo de Tesis presentado para optar por el título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

1999

1999

diciembre de 1999





*A las anguilas,
las dueñas del sexo...*

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a muchas personas que me acompañaron y ayudaron de distinta forma durante todos estos años. Quiero mencionar dos formas de gratitud; primero la gratitud científico-académica, que fue muy importante y hasta crucial para lograr que este trabajo se terminara. En segundo lugar, y no menos importante, está la gratitud humana, aquella que es de todos los días, de un abrazo, una palmada en el hombro, de compartir las horas de trabajo de todos los días, de los asados de fin de semana...

No me resulta una tarea fácil recordar a todos los que estuvieron cerca de mí, y seguramente la lista quedará incompleta pues son muchos años de compartir cosas con mucha gente...

Gracias en primer lugar a la Dra. María Cristina Maggese por permitirme siempre desarrollar mis ideas y por poder llevar a cabo gran parte de ellas en el Laboratorio de Embriología Animal; gracias también por su paciencia y sus valiosas opiniones.

Al Dr. Gustavo Somoza, por su co-dirección, su ayuda, su permanente buena voluntad y por su constante empuje en todo el trabajo endocrinológico.

A la Dra. Graciela Guerrero por sus consejos, por su continuo apoyo y por su buena y permanente disposición para ser mi consejera de Tesis.

Gracias al Dr. Mario Matkovic, quien me brindó su tiempo, dedicación y amistad durante mis primeros pasos en la investigación y el mundo de los peces.

Gracias a la gente del Laboratorio 80, Paula, Fabi, Dante, Cristian y Luz, por todo lo que hicimos juntos académicamente y durante las campañas, por compartir (y casi convivir) durante tantos años y por su gran capacidad profesional, pero sobre todo gracias por su gran amistad. A mis amigos Pablo, el Mono, Alejandro, Juan y Diego, por su gran ayuda y

compañía durante muchas salidas de pesca; siempre estuvieron listos para salir, y jamás le hicieron asco a nada...

A la gente del Laboratorio de Embriología; Graciela, Cecilia, Juan y Fernando, por compartir mucho tiempo de convivencia y porque cada uno a su manera enriqueció mis días de trabajo.

A Hernán y a Carina, por su gran ayuda en el complejo mundo de la microscopía óptica y electrónica. A Carina Lopez y Andrea Stefano, por estar siempre listas para darme un consejo y su ayuda. A Nora Ceballos, Andrea Pozzi y Fabián Canosa, por permitirme el uso (y abuso) de su computadora, para poder llegar a tiempo. A los Dres. Javier Calcagno y Enrique Marschoff, por ayudarme a interpretar estadísticamente muchos resultados que no estaban a la vista.

Al Sr. Gabriel Rosa, por el gran esfuerzo que realiza a diario, para tratar de que todos los equipos anden bien, y por toda la ayuda que supo darme.

A Marcela Lacroix, porque hace ya mucho tiempo, fue la primera en enseñarme los secretos del laboratorio fotográfico.

La revisión crítica (y a veces dura) del manuscrito se la debo entre otros al Dr. Paz (Pelusa) y al Dr. Somoza (Mono). Gracias por el esfuerzo y por no tirármelo por la cabeza.

A mi compadre Sergio Heimsath, por tantos buenos años de discusión científica sobre peces y cerveza, pero sobre todo por su amistad incondicional.

Al Dr. Pablo Picca, por su gran ayuda en el trabajo fotográfico y por ser un gran amigo.

A mis queridos Andrea, Gustavo, Chavi, Alberto, Graciela, Marcela, Leo, Inés y Rafael, por estar siempre cerca para compartir un momento y para apoyarme con una palabra

A la Universidad de Buenos Aires, a la Facultad de Ciencias. Exactas y Naturales y especialmente al Departamento de Ciencias Biológicas, ya que en este último he conseguido durante mis años de investigación, apoyo, asesoramiento científico y sobre todo un ambiente grato en donde he podido desarrollar mis tareas en total libertad.

A Martha y a Tino, por todo el esfuerzo, la confianza y el cariño que pusieron para que un día empezara y hoy llegara a terminar todo esto, por sus consejos y apoyo

permanente, porque siempre me dejaron elegir... y sobre todo por enseñarme que más importante que ser Licenciado o Doctor, es ser Señor. Muchas gracias viejos...

A toda mi familia, por algo muy simple, pero extremadamente valioso, ser Mi familia.

A Diana, mi mejor amiga, por estar siempre a mi lado... dándome ánimo, consejo y todo su amor.

A Larita, porque siempre que llego a casa me regala su mejor sonrisa y su más fuerte abrazo, haciéndome olvidar la mufa y los problemas cotidianos, y por ser el motivo justo para querer seguir adelante.

Al bebé que está en camino...porque ya lo quiero.

Finalmente a las anguilas, porque sin saberlo (no me lo hubieran permitido) me dejaron espiar y conocer un poquito de su increíble mundo, y con su sacrificio me enseñaron responsabilidad por lo que hago.

*Comparte tus conocimientos,
es la única manera de lograr la
inmortalidad...*

BIOLOGIA REPRODUCTIVA DE LA ANGIILA CRIOLA *Synbranchus marmoratus* Bloch 1745 (Teleostei: Synbranchidae). OOGÉNESIS E INDUCCIÓN HORMONAL DE LA MADURACIÓN FINAL.

RESUMEN

El presente trabajo se dividió en dos partes. En el **capítulo 1** se describió anatomo-histológicamente el ovario. Se caracterizaron las etapas de la ovogénesis y la dinámica ovárica anual, que mostró cuatro periodos diferentes: (1) reproductivo, (2) de regresión, (3) de reposo y (4) Vitelogénesis. También se analizaron la estructura y función de los centros melano-macrofágicos encontrados en las gónadas. Por último se describió a nivel ultraestructural la aparición y formación de las membranas oocitarias durante el desarrollo folicular.

En el **capítulo 2** fueron identificados los factores de liberación de gonadotropinas (GnRH) presentes en cerebro (variantes salmón y chicken-II). En hipófisis no se inmunodetectó ninguna forma. Se analizaron las posibles causas. Finalmente se realizaron experiencias de inducción de la maduración final y ovulación de gametas usando un análogo superactivo de GnRH y un antagonista dopaminérgico. Los efectos se evaluaron utilizando los siguientes parámetros: (1) liberación de gametas, (2) histología gonadal y (3) niveles de esteroides sexuales en sangre. Los resultados obtenidos demostraron que: (1) El tratamiento no produjo liberación de gametas. (2) Las gónadas femeninas mostraron inicio de reversión sexual en la totalidad de los casos y (3) los niveles de testosterona y estradiol en sangre aumentaron significativamente respecto de los animales control.

PALABRAS CLAVE: *Synbranchus marmoratus*, reproducción, ovogénesis, GnRH, centro melanomacrofágico, esteroides sexuales, reversión sexual, hermafroditismo, protoginia.

**REPRODUCTIVE BIOLOGY IN THE SWAMP EEL *Synbranchus marmoratus* Bloch 1745 (Teleostei: Synbranchidae).
OOGENESIS AND HORMONAL INDUCTION OF FINAL MATURATION
AND OVULATION**

ABSTRACT

In the first chapter, the anatomy and histology of ovaries were described and different stages of oogenesis and ovarian dynamic were characterized. The annual ovarian dynamic showed four stages: (1) Reproductive, (2) Regressed, (3) Rest and (4) Vitellogenic period. The structure and function of melanomacrophage centers in gonads was also analyzed. Oocyte membranes were ultrastructurally studied along follicular growth.

In chapter 2, brain and pituitary gonadotropin-releasing hormones (GnRH) were characterized. In the brain, salmon and chicken-II GnRH variants were identified. In the hypophysis none was immunodetected. The hormonal induction of final maturation and ovulation using a superactive GnRH analogue and a dopaminergic antagonist was also tested. Gamete releasing, gonadal histology and sex steroid levels were used to evaluate the effect of the hormonal induction. The results showed that: (1) there was no spontaneous gamete-releasing, (2) 100% of treated females begun sex-reversal and, in some cases, reverted totally, (3) testosterone and estradiol levels of treated animals showed significant increase respect to the control ones.

KEY WORDS: swamp eel, *Synbranchus marmoratus*, reproduction, oogenesis, GnRH, melanomacrophage centers, sex steroids, sex reversal, hermaphroditism, protogyny.

INDICE

	<i>página</i>
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INDICE	3
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	7
2. OBJETIVOS	16

CAPÍTULO 1: ANATOMIA OVÁRICA Y OOGÉNESIS

3. INTRODUCCIÓN	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1. OBTENCIÓN DE LOS ANIMALES	25
4.1.1. Cuerpos de agua muestreados	25
4.1.2. Artes de pesca empleadas	28
4.1.3. Transporte y mantenimiento de los animales	30
4.2. PROCESAMIENTO DE LOS EJEMPLARES, OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS Y METODOLOGIA UTILIZADA	31
4.2.1. Parámetros morfométricos considerados	31
4.2.2. procesamiento de las muestras	33
4.2.3. Biopsias	34
4.2.4. Escala de maduración oocitaria	37
4.2.5. Oviducto y estructura de la papila urogenital	37
4.2.6. Dinámica ovárica	38

4.2.7. Centros melanomacrofágicos	39
5. RESULTADOS	41
5.1. ANATOMÍA DEL OVARIO	41
5.1.1. Anatomía macroscópica	41
5.1.2. Anatomía microscópica	45
5.1.3. Oviducto y estructura de la papila urogenital.	48
5.2. OOGENESIS	48
5.2.1. Etapas de la ovogénesis	48
5.2.2. Centro melano-macrofágicos	67
5.2.3. Ultraestructura de la zona cortical del folículo ovárico	72
5.3. DINÁMICA OVÁRICA	84
6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	88
6.1. OBTENCIÓN DE LOS EJEMPLARES	88
6.2. ANATOMIA MACRO Y MICROSCÓPICA DEL OVARIO	92
6.3. CENTROS MELANOMACROFÁGICOS	100
6.4. OOGÉNESIS Y DINÁMICA OVÁRICA	107
6.5. REVERSIÓN SEXUAL	110

CAPÍTULO 2: INDUCCIÓN HORMONAL DE LA MADURACIÓN FINAL Y OVULACIÓN DE GAMETAS
--

7. INTRODUCCIÓN	114
8. MATERIALES Y METODOS	125
8.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS VARIANTES ENDÓGENAS	

DE GnRH	125
8.1.1. obtención y procesado de las muestras de tejido nervioso	125
8.1.2 HPLC	125
8.1.3. RIA	126
8.2. INDUCCIÓN DE LA MADURACIÓN FINAL Y OVULACIÓN DE GAMETAS	129
8.2.1. Obtención y mantenimiento de los ejemplares	129
8.2.2. Desarrollo de las experiencias	130
8.3. DOSAJE DE ESTEROIDES SEXUALES EN SANGRE	132
8.3.1. Extracción de sangre y obtención de sueros	132
8.3.2. Extracción de esteroides y RIA	133
9. RESULTADOS	134
9.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS VARIANTES ENDÓGENAS DE GnRH	134
9.2. INDUCCIÓN DE LA MADURACIÓN FINAL DE GAMETAS	137
9.3. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LAS GÓNADAS DE LOS ANIMALES TRATADOS	137
9.4. DOSAJE DE ESTEROIDES SEXUALES	139
10. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	143
11. CONCLUSIONES GENERALES	152
12. BIBLIOGRAFIA	156

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

En los últimos años, el estudio de la biología reproductiva de los peces teleósteos ha evidenciado un importante número de valiosos aportes que consignan una serie de características comunes, aunque simultáneamente muestran una gran variabilidad que no permite realizar generalizaciones. El interés en esta área se ve reflejado en la gran cantidad de trabajos y revisiones publicados al respecto (Grier, 1981; Brusle, 1985; Cussac *et al*, 1985, Cussac & Maggese, 1986; Crim *et al*, 1986; Van Der Kraak & Donaldson, 1986; Matkovic & Pisanó, 1989; Matkovic, 1989; Billard, 1990).

Esta gran variedad de patrones reproductivos es lógica si se tiene en cuenta que en el suborden Teleostei se encuentra la mayoría de las 20.000 especies de peces conocidas en la actualidad, cuyo origen filogenético se remonta al periodo Jurásico (Romer, 1966). Asimismo, y por su antigüedad, es un grupo que ha desarrollado gran variedad de corrientes evolutivas que llevaron a muchas especies a poseer características estructurales, fisiológicas y comportamentales muy particulares, configurando una notable diversidad de sistemas reproductivos y patrones sexuales (Sadovy & Shapiro, 1987).

Debido a esta variabilidad es importante el estudio de los hábitos y biología reproductiva de aquellas especies autóctonas que, por su distribución geográfica, incidencia ecológica y patrones sexuales peculiares, puedan contribuir a un mejor entendimiento de los mecanismos básicos que regulan la reproducción. Estos conocimientos pueden resultar de interés en la elección de especies cuyas características los harían aptos para su cría en cautiverio (piscicultura).

En nuestro país en particular, existen grandes cuencas hidrográficas que alcanzan a cubrir extensas superficies con una abundante y variada ictiofauna (Ringuelet *et al*, 1967). Gran parte de esta última no ha sido aún estudiada, y los pocos conocimientos

que se poseen son básicamente taxonómicos y sólo en algunos casos ecológicos y anatómicos.

El orden Synbranchiformes (Pisces, Teleostei) comprende un grupo de peces con características anatómicas muy particulares. La ausencia de aletas pares (al menos en estadios post-larvales), la reducción de las aletas dorsal, ventral y caudal, y su transformación en delgados rebordes epidérmicos sin radios que en la mayoría de los casos confluyen en una única aleta dorso-caudo-ventral, así como la ausencia o reducción casi total de las escamas en la mayoría de los géneros, le confieren un marcado aspecto de tipo "anguiliforme". A pesar de dichas características, el orden no se encuentra en absoluto relacionado con las verdaderas anguilas, pertenecientes al orden Anguilliformes (Superorden Elopomorpha).

La clasificación sistemática de los Synbranchiformes considerada corresponde a la adoptada por Nelson (1994), y es la siguiente:

PHYLUM	Chordata
SUBPHYLUM	Vertebrata (Craniata)
SUPERCLASE	Gnathostomata
GRADO	Teleostomi
CLASE	Actinopterygii
DIVISIÓN	Teleostei
SUB DIVISIÓN	Euteleostei
SUPERORDEN	Acanthopterygii
SERIE	Percomorpha

ORDEN	Synbranchiformes (Synbranchii)
SUBORDEN	Synbranchioidei
FAMILIA	Chaudhuriidae (5 sp.)
FAMILIA	Mastacembelidae: 2 subflias. 4 gros, 57 sp.
FAMILIA	Synbranchidae
SUB-FAMILIA	Macrotreminae (un solo género)
GÉNERO	<i>Macrotrema</i> (1 sp.)
SUB-FAMILIA	Synbranchinae (3 generos)
GÉNERO	<i>Ophisternon</i> (6 sp.)
	<i>Monopterus</i> (15 sp.)
	<i>Synbranchus</i> (2 sp.)

Este último género presenta solo dos especies: *S. marmoratus*
S. madeirae

De las 878 especies, 84 son exclusivamente dulceacuicolas. Los géneros que conforman la familia Synbranchidae, se distribuyen ampliamente en toda la zona tropical y neotropical del viejo y nuevo mundo, y se encuentran especialmente bien representados en Asia y Australasia (Rosen & Greenwood, 1976).

A excepción de *Synbranchus madeirae*, cuya distribución se restringe al Río Madeira en Bolivia, el único representante de la familia Synbranchidae presente en casi toda Centro y Sudamérica es *Synbranchus marmoratus*. Su distribución es homogénea desde Guatemala hasta el centro de la provincia de Buenos Aires (Argentina).

Synbranchus marmoratus (figura 1a), habita en agua dulce y aguas estuarinas. Vive en ambientes lóticos y lénticos de aguas tranquilas, así como pantanos, juncuales, zonas inundables y terrenos con aguas temporales sujetas a sequías y/o desecación total

(Castello, 1973; Lüling, 1980). Desarrolla todo su ciclo de vida en un área localizada, sin presentar ningún tipo de movimiento migratorio. Es de hábitos crepusculares y nocturnos. Suele permanecer dentro de cuevas de estructura tubular que construye utilizando la musculatura de su cabeza en las orillas barrosas de los arroyos (figura 1b) o también debajo de las raíces de juncos, camalotes y otras macrofitas acuáticas. Alcanza en nuestro país longitudes máximas de 120-140 cm y pesos aproximados de 1,5 Kg, llegando en algunos casos a pesar 2,0 Kg.

Los ojos, muy pequeños, se ubican en el extremo anterior de la cabeza, de forma ahusada, muy cerca de la boca, y se encuentran cubiertos por una gruesa capa de epidermis, lo que supone una baja capacidad visual (figura 1a). Algunas especies del viejo mundo son de hábitos totalmente cavernícolas, y en el Orden en general se observa una reducción en el tamaño de los ojos con una tendencia hacia la atrofia total de los mismos (Rosen & Greenwood, 1976).

El cuerpo es largo, de estructura cilíndrica y maciza y está constituido por una serie de paquetes musculares muy desarrollados dispuestos en forma de “V” dispuestos en sentido longitudinal. La piel es gruesa, libre de escamas y muy resistente a la tracción. La epidermis es de tipo glandular muy desarrollado y produce una abundante mucosidad que recubre toda la superficie corporal.

Pese a que las características organolépticas no han sido establecidas, la carne de *S. marmoratus* tiene muy buena aceptación por su sabor y calidad. El peso muscular del animal limpio y faenado es de aproximadamente el 70% del peso total, y las únicas estructuras óseas presentes son la columna vertebral y el cráneo. Esto la convierte en un potencial recurso alimenticio de alto contenido proteico. Sin embargo, el consumo de este animal está limitado localmente.

Figura 1: a) vista general de la cabeza de la anguila criolla. Se observa claramente el pequeño tamaño de los ojos. b) anguila criolla saliendo de una cueva. La entrada de la misma se encuentra generalmente sobre el nivel del agua.



Posee tres modalidades respiratorias distintas, dos de ellas muy eficientes (Ringuelet *et al*, 1967). A la típica respiración branquial de los teleósteos, se le suma la capacidad que presentan los miembros de este género de captar oxígeno del aire por medio del epitelio buco-faríngeo y también del epitelio intestinal. Las aberturas operculares se encuentran recubiertas por repliegues de la piel y la eliminación del agua incorporada durante la ventilación de las branquias se realiza por medio de un único orificio de salida u orificio opercular de naturaleza elástico-muscular ubicado en posición ventral. Estas modificaciones transforman la cavidad branquial en un saco o cavidad bucofaríngea con un elevado grado de irrigación. Estas modificaciones estructurales le han permitido desarrollar un mecanismo de respiración aérea muy eficiente que se basa en la captación del oxígeno atmosférico en forma directa del aire y produciendo la hematosis a nivel del epitelio de la cavidad bucofaríngea (Graham, 1994; Graham *et al*, 1987; Johansen, 1966; Ringuelet, 1967; Munshi & Singh, 1968; Munshi *et al*, 1990). Es común observar en cautiverio, como los animales sacan la boca fuera del agua, toman una bocanada de aire (dilatando la cavidad bucal y cerrando el orificio opercular) e incluso se los puede ver respirando con la boca fuera del agua durante periodos prolongados. Este sistema de ventilación le confiere la posibilidad de ocupar ambientes en donde la concentración de oxígeno disuelto es muy baja o muy fluctuante y en las cuales otras especies de peces no pueden vivir. Puede desplazarse fuera del agua a considerable distancia y resistir periodos de sequía prolongados como suelen presentar algunos cuerpos de agua temporarios o sujetos a variaciones del régimen pluvial (zanjas, juncas, pantanos, etc.). De la misma manera se ve facilitado su transporte durante largos periodos sin que sufra daño alguno.

Presenta una alta resistencia al desarrollo de infecciones de tipo fúngico y bacterianas, presentando en cautiverio pocos problemas de origen sanitario. A pesar de ser frecuente la presencia de un alto número de parásitos en la cavidad celómica y musculatura cefálica (nematodos y digeneos respectivamente) la condición general del animal no parece estar afectada por los mismos en cuanto al desarrollo y estado sexual.

Todas estas características la hacen muy interesante desde el punto de vista biológico y ecológico, y le dan gran importancia en su elección como modelo experimental o en planes de acuicultura.

SEXO Y HERMAFRODITISMO

La dualidad genética y fisiológica de las células germinales conforman las bases fundamentales de la sexualidad en los organismos vivos. La evolución de complejos sistemas sexuales en algunas especies es sin duda alguna el resultado de la selección natural, y les ha brindado, en última instancia, una ventaja adaptativa que se ve reflejada directamente en un aumento del éxito reproductivo.

En la naturaleza, el control del sexo es en primera instancia de tipo genético y se manifiesta en el desarrollo primario de las gónadas. Estas gónadas diferenciadas son las encargadas en un segundo paso de secretar determinadas sustancias, las hormonas, que controlan los caracteres sexuales secundarios y el comportamiento sexual. Sin embargo, el desarrollo y cambio de sexo en los peces está también regido por procesos bioquímicos que pueden ser influenciados por variaciones de los factores ambientales.

Entre todos los grupos de peces, el superorden Teleostei es el único que presenta casos de reversión sexual funcional como un fenómeno natural. En muchas especies de varias familias, el hermafroditismo y la reversión sexual constituyen el modo normal de reproducción. El estudio de los mecanismos que dirigen la reversión sexual y el control del sexo tiene no solo importancia académica sino también valor económico en acuicultura.

Existe gran variedad de formas de hermafroditismo funcional entre los peces óseos. Según Sadovy & Shapiro (1987) una especie es hermafrodita cuando “una proporción sustancial de individuos en una población, funciona con los dos sexos ya sea en forma simultánea o secuencial en algún momento de su vida”. Con la excepción de

especies unisexuadas, aquellas especies que no cumplieran con estas características, podrían considerarse gonocóricas (Sadovy & Shapiro, 1987).

Esta definición, como ya se dijo, debe aplicarse a especies, y la ocurrencia de casos en la población debe ser frecuente. Por otro lado, la presencia de tejido gonadal no funcional de un sexo en individuos que contienen tejido gonadal funcional del otro sexo, no se considera suficiente para considerar a esa especie hermafrodita.

En peces han sido descritas tres formas básicas de hermafroditismo: **protoginia**, en la cual todos o algunos individuos de la población funcionan primero como hembras y más tarde exclusivamente como machos. **Protandria**, en donde el cambio de sexo es de macho a hembra, y por último **hermafroditismo simultáneo**, en el cual los individuos funcionan al mismo tiempo como hembras y machos.

Existen variaciones sobre estos tres patrones básicos. Una de ellas es la presencia de dos tipos de desarrollo sexual en una misma población. Este es el caso de los **hermafroditas protogínicos diándricos**, en donde algunos machos se diferencian como tales durante la embriogénesis (machos primarios) y otros en cambio lo hacen por reversión sexual de hembras (machos secundarios). El mismo patrón se observa en el caso de los **hermafroditas protándricos digínicos** (dos tipos de hembras) (Sadovy & Shapiro, 1987).

Bibliografía consultada y observaciones realizadas en nuestro laboratorio demuestran que *Synbranchus marmoratus* presenta en su ontogenia un patrón de diferenciación sexual hermafrodita secuencial de tipo protogínico diándrico, al igual que otras especies del mismo orden (Liem, 1963; Atz, 1964; Chan & Phillips, 1967a, b; Chan *et al.*, 1967; Chan *et al.*, 1972, Lo Nostro & Guerrero, 1996).

S. marmoratus sufre un proceso natural de reversión sexual a través de una maduración sucesiva de las gametas femeninas y masculinas en diferentes momentos de su historia individual (Chan & Yeung, 1983). Un alto porcentaje de los ejemplares que nacen desarrollan sus gónadas como hembras (aproximadamente 90%), y en determinado momento de la ontogenia, revierten su sexo para formar un testículo funcional. Este

pasaje implica la existencia durante un breve tiempo de una fase intersexuada, en la cual coexisten en la gónada, elementos germinales de ambos sexos. A estos machos originados por reversión sexual de una hembra, se los conoce como machos secundarios (Liem, 1963; Atz, 1964; Chan & Phillips, 1967a; Chan *et al*, 1972, Lo Nostro & Guerrero, 1996). Por otro lado un pequeño porcentaje (aproximadamente 10%) de los ejemplares nacidos se diferencian directamente como machos y se los denomina primarios. Su estructura testicular es significativamente distinta a aquella observada en los machos secundarios (Lo Nostro & Guerrero, 1996).

Cabe señalar que el superorden Teleostei es el único en donde este fenómeno ocurre en forma natural y funcional (Chan & Yeung, 1983).

Considerando que este proceso es controlado tanto por factores intrínsecos (genéticos y hormonales) como extrínsecos (ambientales), es realmente interesante conocer en profundidad los mecanismos que definen y limitan los procesos de diferenciación que se verifican en *Synbranchus marmoratus*. Esto permitiría no sólo ampliar el conocimiento de los fenómenos básicos que intervienen en los procesos de diferenciación celular sino también aplicar dichos conocimientos en el control del sexo como parte de programas de investigación y piscicultura (Pandian & Sheela, 1995).

2. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo ha sido conocer algunos aspectos de la biología reproductiva de hembras de la anguila criolla *Synbranchus marmoratus*.

Para tal fin y dado el escaso conocimiento del tema en esta especie, el plan de trabajo se estructuró en dos partes. En la primera (**capítulo 1**), básicamente descriptiva, se caracterizó anatómica e histológicamente el ovario de la anguila, y se estudió la oogénesis y la dinámica ovárica. En la segunda parte (**capítulo 2**), se identificaron los factores de liberación de gonadotrofinas (GnRH) presentes en el cerebro e hipófisis de la anguila criolla y se llevaron a cabo experiencias de inducción de la maduración final de gametas y ovulación utilizando análogos superactivos de las formas de GnRH identificadas.

ANATOMÍA OVÁRICA Y OOGÉNESIS

Capítulo 1

3. INTRODUCCIÓN

❖ EL SISTEMA REPRODUCTOR FEMENINO EN LOS PECES TELEOSTEOS

El sistema reproductor femenino de los teleósteos es muy variable en lo que a mecanismos y modalidades reproductivas concierne. En la mayoría de las especies, el ovario es un órgano par que se dispone en sentido longitudinal en la cavidad del cuerpo y cuyos extremos caudales se unen entre sí antes de desembocar en la papila urogenital. En algunos grupos sin embargo, ambos ovarios pueden fusionarse en un único órgano durante el desarrollo temprano, y en otros una de los dos puede degenerar, quedando en ambos casos una única gónada funcional (Nagahama 1983).

De acuerdo con el patrón de desarrollo y maduración de los elementos germinales se han establecido básicamente tres tipos de ovarios (Wallace & Selman, 1981). A) ovarios sincronos totales: se encuentran en aquellos peces que desovan una sola vez en su vida y después mueren. Este tipo de ovario se presenta en algunos salmónidos (*Oncorhynchus kisutch*, *O. nerka*, *O. gorbuscha*). B) ovarios sincronos por grupos: son aquellos que presentan principalmente dos camadas o cohortes mayoritarias de oocitos en distinto estadio de desarrollo simultáneo. Es decir, en el mismo momento se encuentra una población de oocitos primarios en estado de latencia, y otra población de oocitos en desarrollo “sincrónico” que serán ovulados durante el periodo reproductivo. Este patrón corresponde a aquellos teleósteos que se reproducen una vez al año y tienen periodos reproductivos relativamente cortos. (*Salmo trutta*, *Odontheistes bonariensis*). C) ovarios asincronos (metácronos): los cuales contienen en todo momento oocitos en los distintos estadios de desarrollo, sin presentar poblaciones dominantes. En este caso, los huevos se originan a partir de una población heterogénea de oocitos en distintas etapas de desarrollo, que son ovulados en por lo menos dos momentos distintos a lo largo de un

periodo reproductivo prolongado (por ej. *Dicentrarchus labrax*) Existen variaciones de este tercer patrón, como en el caso del stickleback, en el cual en vez de existir una población heterogénea de oocitos en diversos estado de desarrollo, se observan solo tres camadas perfectamente diferenciables de oocitos en crecimiento. Estas camadas alcanzarán sucesivamente la maduración y serán ovulados en tres momentos distintos de la época reproductiva.

Por supuesto que los términos “desovador u ovulador sincrónico o asincrónico” describen en forma aproximada los dos extremos de un proceso continuo, y es común, en los teleosteos, encontrar todo tipo de variaciones a estos patrones (Tyler & Sumpter, 1996).

El tamaño de los ovarios en los peces es muy variable dependiendo de la especie, y del momento del año. En los desovadores sincrónicos, el índice gonadosomático (IGS) definido como el peso gonadal / (peso corporal - peso gonadal) X 100 se encuentra entre 18 y 25, pero puede alcanzar, y aún exceder valores de 40 (tal es el caso de la anguila japonesa *Anguilla japonica*) (Selman & Wallace, 1989; Tyler & Sumpter, 1996). El IGS en especies asincrónicas es generalmente menor al observado en las sincrónicas, con valores entre 8 y 14. Sin embargo se considera que los ovuladores asincrónicos insumen una mayor cantidad de energía al final de la época reproductiva, que la que invierten los sincrónicos (Tyler & Sumpter, 1996).

El ovario posee una cavidad que se continua con un oviducto de longitud y características muy variables. En muchas especies se considera que esta cavidad es simplemente un lugar de almacenaje para los oocitos ovulados que se acumulan temporalmente hasta que son llevados al exterior a través del oviducto y la papila urogenital. El origen de esta cavidad ha sido estudiado en diversos teleósteos, y se ha visto que su estructura y función varían entre las distintas especies (Lepori, 1980). En el goldfish, *Carassius auratus*, está formada por la fusión de los bordes distales del ovario con las paredes celómicas dorsolaterales (Takahashi & Takano, 1971). En la tilapia, *Tilapia mossambica*, se forma por la fusión de dos bordes, estroma proximal y distal del

ovario (Nakamura & Takahashi, 1973). Por otro lado, se ha visto en algunas especies que las células de la cavidad ovárica pueden tener una activa función secretora. Dicha secreción ayudaría a mantener el estado de hidratación de los oocitos y facilitaría su transporte por el oviducto.

Tyler & Sumpter (1996) se refieren con el término de oocito, al ooplasma rodeado de su oolema y, de acuerdo al grado de crecimiento, a la zona radiata. Estos autores definen al folículo, como el oocito rodeado por las cubiertas de células somáticas (foliculares y tecales). Existe una nueva clasificación que define como folículo al oocito, con las células foliculares y la membrana basal asociada a estas últimas. Dado que ambos tipos celulares se localizan originalmente en el epitelio germinal del ovario, mientras que las células tecales se originan en el estroma ovárico de origen somático (Grier, 1999 en prensa).

❖ OOGENESIS

La oogénesis ha sido descrita en numerosas especies de peces óseos. Para su estudio y mejor interpretación, todo el proceso ha sido dividido, en forma más o menos arbitraria, en diversos estadios de desarrollo teniendo en cuenta características morfológicas, histológicas, fisiológicas y bioquímicas. Estas características incluyen el tamaño de los oocitos, características del tejido somático presente, tipo, cantidad y distribución de las distintas inclusiones celulares así como la morfología de los núcleos, nucleolos y cromosomas (Nagahama, 1983; Rinchard *et al.*, 1998; Selman & Wallace, 1986). Por lo tanto el número y las características de los distintos estadios varía no sólo entre las distintas especies, sino también entre los diversos autores.

A pesar de las grandes variaciones encontradas, el proceso de oogénesis presenta una serie de características generales que son tan comunes a los teleosteos como a los mamíferos en general.

En una primera fase las células madres de las oogonias o “stem cells” aumentan su número como consecuencia de sucesivas divisiones mitóticas (fase proliferativa). Pasado este periodo, las oogonias entran en la etapa temprana de la primera profase meiótica. Durante este lapso, ocurre la duplicación del ADN (pre-leptotene), los cromosomas homólogos se aparean y comienzan a condensarse (leptotene-zigotene). Estas tétradas se acortan y engrosan formando los complejos sinaptonémicos (paquitene-diplotene). Estos eventos se conocen como “estadio de cromatina nucleolar” (Selman & Wallace, 1989).

Detenido en diplotene tardío de la primer profase meiótica, el oocito comienza un largo periodo de crecimiento, concomitante con el desarrollo de las células foliculares que lo envuelven. En esta etapa se observa un aumento en el número de nucleolos, lo que indica una activa síntesis de ARN. Los nucleolos se disponen típicamente ocupando la periferia del núcleo, en contacto con la membrana nuclear (etapa perinucleolar). Al final de esta etapa de crecimiento, el oocito se encuentra rodeado por una capa continua de células foliculares o de la granulosa y una capa de células tecales con numerosos capilares sanguíneos. Durante la etapa perinucleolar, el diámetro de los oocitos puede incrementarse aproximadamente 100 veces y en algunas especies incluso más. En muchos peces teleósteos, en esta fase comienza la formación de la envoltura vitelina. (Selman & Wallace, 1986, 1989, Tyler & Sumpter, 1996).

El impresionante aumento en la masa oocitaria se debe a la acumulación de sustancias de reserva en el ovario que, luego de la fecundación, serán utilizadas por el embrión en desarrollo como fuente energética, hasta que la larva alcance la edad suficiente para alimentarse por sí sola. Estas sustancias nutritivas reciben en conjunto el nombre de vitelo y están compuestas básicamente por proteínas de origen hepático. Dado que el vitelo o yema constituye un 80-90% del peso seco de los oocitos de la

mayoría de los vertebrados inferiores, puede considerarse que la vitelogénesis representa una de las etapas más importantes de la oogenénesis.

La secuencia de eventos que comprende la vitelogénesis ha sido estudiada en peces, aves y anfibios. Puede sintetizarse en cuatro etapas: 1) síntesis y secreción hepática de vitelogeninas (proteína precursora del vitelo) como respuesta a los niveles de estrógenos circulantes, 2) transporte de estas proteínas por el torrente sanguíneo materno, a la superficie del oocito en crecimiento, 3) incorporación selectiva de la vitelogenina en el oocito por endocitosis y, 4) traslocación citoplasmática de la vitelogenina y formación de las plaquetas vitelinas (por fraccionamiento de la vitelogenina en lipovitelina y fosvitina) (Mommensen y Walsh, 1988).

Finalizada la vitelogénesis, comienzan los procesos de maduración de los oocitos. Los siguientes eventos resumen todo el proceso de reactivación y finalización de la meiosis. 1) La vesícula germinal (núcleo del oocito) migra hacia la periferia y la membrana nuclear se disgrega; 2) los cromosomas terminan de condensarse y se inicia la primera metafase meiótica, seguida de la eliminación del primer corpúsculo polar y 3) Comienza la metafase de la segunda división meiótica, al final de la cual los cromosomas quedan nuevamente arrestados. En los teleósteos, así como en los vertebrados en general, a partir de este momento el oocito ha madurado y es fertilizable. La ovulación puede ocurrir tanto al inicio del proceso de maduración como al final del mismo. Ambas etapas están dirigidas y reguladas por una serie de estímulos hormonales apropiados (Nagahama, 1983).

Los oocitos desde las primeras etapas del desarrollo se encuentran rodeados por una capa de células foliculares. A medida que éste crece, estas células se multiplican formando una envoltura continua denominada granulosa o capa folicular. Simultáneamente algunos elementos del estroma conectivo adyacente se organizan y diferencian en una capa de células que recubre a la capa folicular, denominada teca. Ambas capas, de espesor y estructura variable, se encuentran separadas entre sí por una conspicua membrana basal. Ambas envolturas participan activamente en el transporte de

oxígeno y nutrientes al oocito, así como también en la producción de diversos esteroides sexuales que regulan el crecimiento y la maduración de las células germinales. (Nagahama *et al.*, 1982; Rinchard *et al.*, 1998).

Entre la membrana plasmática del oocito y la capa de la granulosa, se desarrolla una envoltura acelular cuya estructura y composición es variable, dependiendo de la especie y del grado de desarrollo del folículo. Debido al uso de una terminología muy amplia que a veces responde a erróneas homologías con aquellas membranas presentes en otros grupos de vertebrados, el nombre que se le asigna en los peces a esta envoltura, puede resultar confuso (envoltura oocitaria, envoltura vitelina, zona radiata, zona pelúcida, corion). En contacto con el oocito, esta envoltura tiene apariencia estriada al microscopio óptico, y es comúnmente llamada “zona radiata” (en adelante envoltura vitelina). Su espesor puede variar entre los 7 y 40 μm de diámetro.

En la envoltura vitelina, a nivel ultraestructural, se observa que las estrias corresponden a los puntos de penetración de procesos celulares o proyecciones citoplasmáticas (microvellosidades) del oocito y de las células foliculares. Las digitaciones de ambos tipos celulares se ponen en contacto en distintos puntos, permitiendo de esta manera el intercambio y la incorporación de sustancias.

El origen de la envoltura vitelina, es todavía controvertido. En *Oryzias latipes* (Tesoriero, 1977) y *Fundulus heteroclitus* (Dumont y Brummett, 1985) así como en otras especies, estaría formada únicamente por el oocito, clasificándose como una envoltura primaria. En *Odontheistes bonariensis* (Fausto *et al.*, 1993) en cambio, el oocito formaría la zona más interna, mientras que las células foliculares contribuirían a la formación de la zona más externa, siendo ésta una envoltura de tipo secundario (origen mixto). Más recientemente se ha visto utilizando técnicas de inmunomarcación específicas para algunas glicoproteínas de la envoltura vitelina de la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), que serían de origen hepático, y que el inicio de su síntesis sería anterior a la síntesis y captura activa de vitelogenina por parte del oocito (Yamagami *et al.*, 1992, Hyllner *et al.*, 1991). Estos datos concuerdan con el concepto general

señalado por Hyllner *et al.* (1991), quienes proponen que dado que la mayor proporción de proteínas que conforman la envoltura vitelina de los teleosteos, se sintetizan fuera del ovario, es en este caso una envoltura de origen principalmente terciario.

En la superficie de los huevos de algunas especies pueden encontrarse estructuras como filamentos coriónicos y cubiertas gelatinosas o adhesivas, que contribuyen a aglutinar los huevos entre sí para formar masas homogéneas y evita su dispersión, o como elemento de fijación a un determinado sustrato (Matkovic *et al.*, 1989; Cussac y Maggese, 1986; Strüssman, 1989). Los estudios histoquímicos realizados indican que en la composición de la mayoría de estas estructuras intervienen principalmente carbohidratos y glicoproteínas (Strüssman, 1989).

En la familia *Synbranchidae* los procesos que caracterizan la oógenesis han sido poco estudiados. Los aportes más significativos y prácticamente únicos, son los trabajos llevados a cabo por Chan & Phillips (1967b) y Chan *et al.* (1967) en *Monopterus albus*. Pese a que esta especie y *Synbranchus marmoratus* se encuentran altamente relacionadas filogenéticamente, se hallan totalmente aisladas geográficamente. Por este motivo, es necesario ser muy cuidadoso y cauto en la extrapolación de datos y comparaciones interespecíficas.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. OBTENCIÓN DE LOS EJEMPLARES

4.1.1. CUERPOS DE AGUA MUESTREADOS

Los lugares de muestreo se seleccionaron en función de su cercanía al laboratorio y a la abundancia de ejemplares capturables. Los cuerpos de agua utilizados fueron:

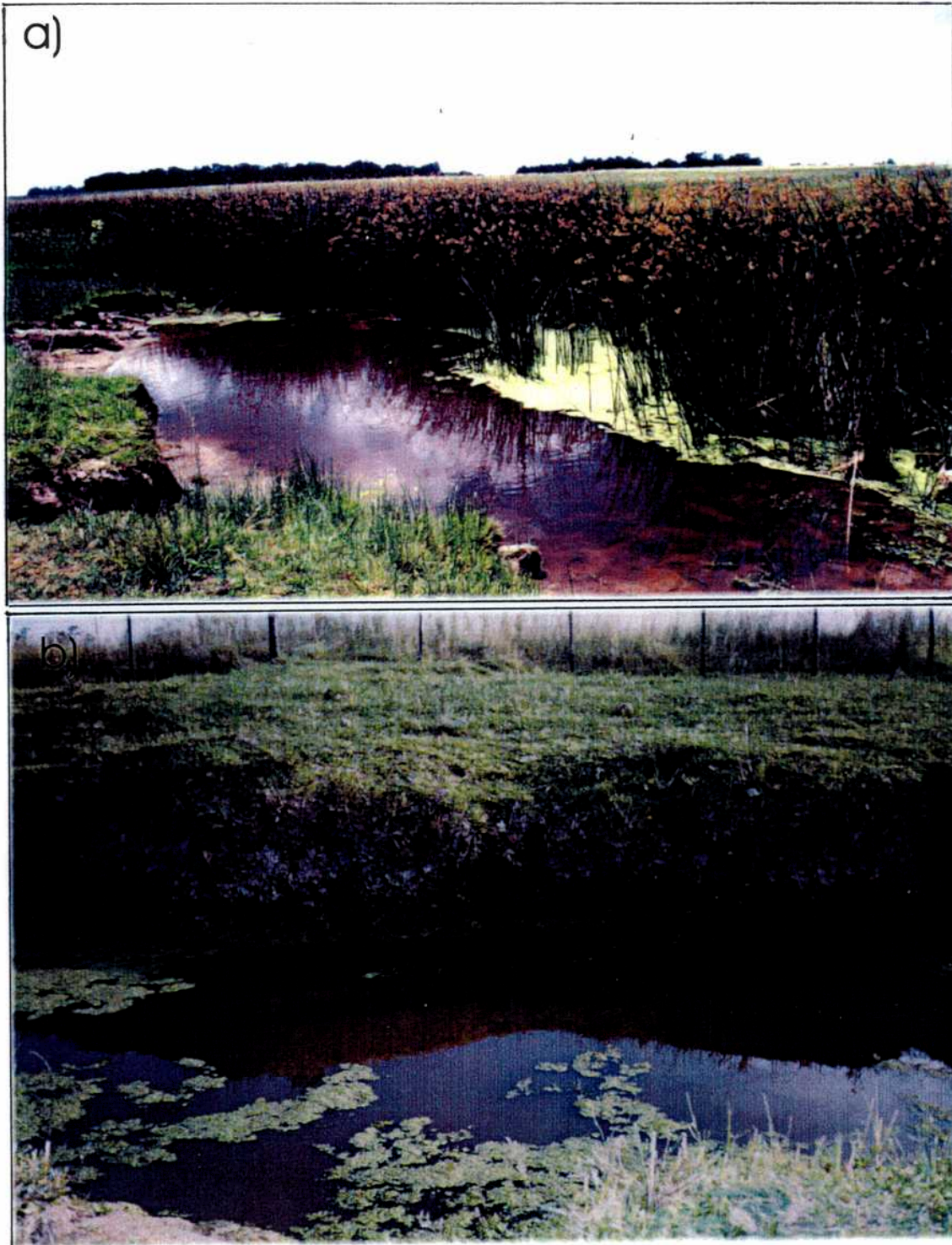
- * Lagunas pertenecientes al Sistema de las Encadenadas del Río Salado (Pcia. de Buenos Aires).
- * Ríos y arroyos de la provincia de Corrientes que desaguan en el río Paraná.
- * Zanjas, junciales y zonas pantanosas en terrenos de inundación del Río Paraná, en la periferia de la ciudad de Santo Tomé (Santa Fe) (figura 2b).
- * Arroyos tributarios del Río Gualeguaychú, en la zona de Saltos de Méndez, Departamento de Gualeguaychú (Entre Ríos).
- * Arroyo Morales, (Partido de General Las Heras, Provincia de Buenos Aires) tributario del Río Luján. Este arroyo posee la característica de tener parte de su recorrido dentro de una propiedad privada, esto aseguró un lugar de muestreo restringido al grupo de trabajo y fue de utilidad para estimar el tamaño de la población de anguilas en un sector determinado del arroyo (aproximadamente 1 Km), caracterizar su evolución en los distintos meses del año y correlacionar las frecuencias de captura con algunas condiciones ambientales y biológicas.

El arroyo Morales presenta cauce angosto y variable entre 2 y 12 m de ancho. Tiene muy escasa pendiente, quedando en algunos sectores estancado. El lecho es arcilloso, con gran cantidad de detritos y restos vegetales. La mayor parte del sector de pesca se encuentra profusamente cubierto por junciales (*Scirpus californicus*) que llegan a cubrir toda la superficie (figuras 2a). Los sectores libres de vegetación presentan macrófitas acuáticas sumergidas y flotantes (*Lemna sp.*, *Hydrocotyle sp.*, *Polygonum sp.*,

Miriophyllum sp.) y helechos acuáticos (*Azolla* sp., *Salvinia* sp.). La macrofauna acompañante identificada está representada por varias especies de peces, madrecitas (*Cnesterodon* sp), tarariras (*Hoplias malabaricus malabaricus*), bagre amarillo (*Pimelodus clarias*), cíclidos (*Aechidens* sp, *Geophagus* sp.), mojarra (*Astyanax* sp), tortugas acuáticas, caracoles acuáticos (*Pomacea* sp) y coipos (*Myocastor coipo*). Existe también, como elemento de interacción con el ecosistema , ganado vacuno que se desplaza por las orillas del arroyo, pisoteando los juncos para beber agua, y varias especies de aves (garzas, caracoleros, gaviotas, patos, cisnes, gallaretas y teros). Muchas de estas especies , como las tarariras, las gaviotas y las garzas son predadores de las anguilas.

Para determinadas experiencias se recurrió a la compra de animales a diversos comerciantes y pescadores que acopian anguilas vivas para venderlas como carnada para pesca deportiva. En estos casos no pudo determinarse con precisión el origen geográfico de los mismos.

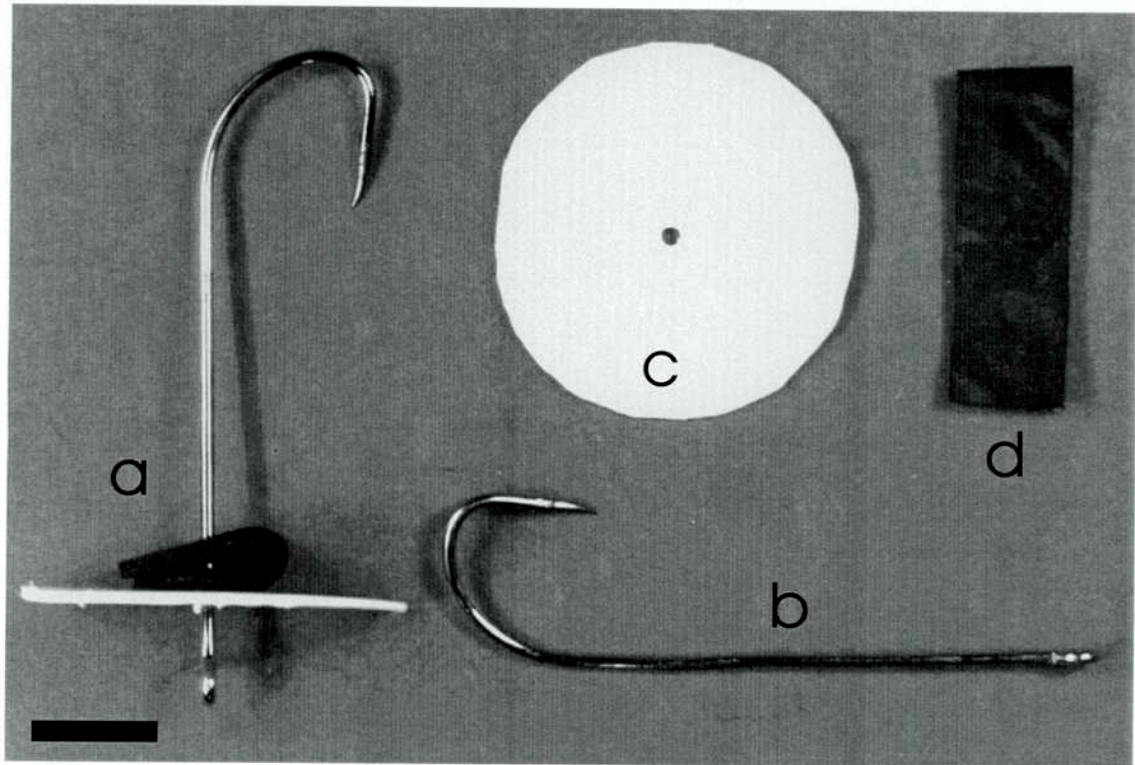
Figura 2: Ambiente típico de la anguila criolla. a) Arroyo Morales (Partido de Gral Las Heras). Las márgenes del arroyo son bajas, poco abruptas y casi todo el cauce se encuentra cubierto de juncos, debajo de los cuales se encuentran las anguilas. b) Arroyo típico de la zona cercana a la ciudad de Santo Tomé (prov. de Santa Fe). En las márgenes, de caída abrupta, se encuentran las bocas de las cuevas de las anguilas.



4.1.2. ARTES DE PESCA EMPLEADAS

Las capturas se realizaron mediante líneas de mano, con boya y anzuelos tipo pata larga de diversos tamaños. A lo largo de los diferentes muestreos, el modelo de línea original fue sujeto a cambios que permitieron capturar a los animales en mejores condiciones. Normalmente la anguila traga rápidamente el cebo, lo que dificulta la extracción del anzuelo sin dañar severamente los órganos internos del animal. Para evitar este problema se eliminó la "muerte" o "traba" del anzuelo limándola, y se colocó en el "ojo" del mismo una placa circular de plástico de alto impacto de 4 cm de diámetro y 1 mm de espesor, asegurada con una pieza de caucho (figura 3). La placa actúa como tope, evitando que el animal se trague el anzuelo. El anzuelo, una vez clavado y aún sin traba, no se desprende gracias a la continua tensión que ejerce el pez sobre el hilo de la línea al tratar de escapar. El sistema demostró ser eficiente en el ciento por ciento de las capturas, obteniéndose todos los animales sin heridas y en excelentes condiciones. El cebo utilizado fue carne vacuna, especialmente corazón, por ser un tejido fibroso difícil de desprenderse del anzuelo.

Figura 3: Arte de pesca utilizada. Se detalla el anzuelo con la muerte limada, la placa de plástico (alto impacto) y la banda de goma que actúan a modo de tope.



4.1.3 TRANSPORTE, MANTENIMIENTO Y ALIMENTACIÓN DE LOS ANIMALES

El transporte de los animales se realizó dentro de bolsas de tela mojadas, en cajas plásticas con un fondo de agua de escasos centímetros. Esto permitió que los animales mantuvieran húmedas la piel y el epitelio bucal, y gracias a su respiración aérea, realizaran una correcta oxigenación. Cuando la temperatura ambiente fue elevada, se agregó hielo al agua para disminuir la tasa metabólica de los animales (Vollmann-Schipper, 1978).

En el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (Universidad de Buenos Aires), se instalaron dos piletas de lona de 1.500 litros de capacidad con tapas de red. Una de ellas fue rellena hasta la mitad con tierra, y la otra mitad con 10 cm (columna de agua) de agua de clorada. La segunda pileta se llenó con 10 cm (columna de agua) de agua de clorada y se colocaron en su interior trozos de caño de PVC y mangueras plásticas de aproximadamente 1 m de largo y diámetros que variaron entre los 3 y 6 cm. En la pileta con tierra se dejaron ocho ejemplares y en la otra veinte, con el objeto de observar la adaptación que presentaban a esos ambientes artificiales.

Se prepararon además, cajas plásticas blanco de 50 y 100 litros de capacidad con tapas de red, para mantener los animales durante las experiencias y hasta el momento de su procesamiento.

Los animales mantenidos en cautiverio fueron alimentados periódicamente con trozos de carne vacuna, caracoles acuáticos vivos del género *Pomacea* sp., peces de pequeño tamaño (*Cnesterodon* sp, *Astyanax* sp, etc) y renacuajos de anfibios (*Bufo* sp., *Leptodactylus* sp.).

4.2. PROCESAMIENTO DE LOS EJEMPLARES Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las anguilas utilizadas fueron anestesiadas con benzocaína disuelta en agua (0.1g/l) (Seigneur, 1984) y colocadas en una camilla de disección confeccionada con medio caño de PVC de 3 cm de diámetro abierto en sentido longitudinal.

Después de medidos y pesados, los animales fueron decapitados. Se disecaron ventrolateralmente a lo largo de la cavidad abdominal, hasta rodear la papila anal. En todos los casos se realizó una observación del estado general de los órganos y se extrajo la gónada para su posterior estudio.

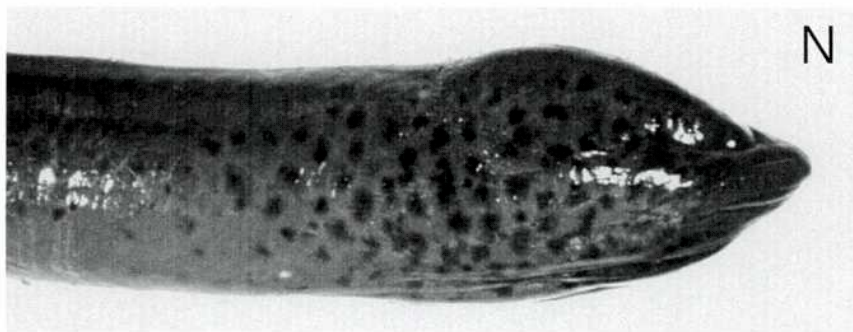
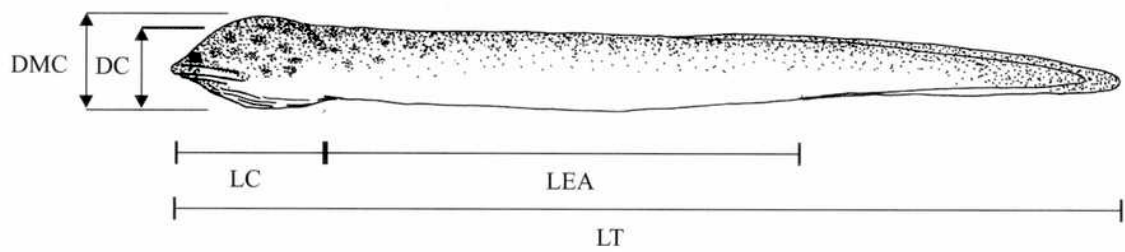
4.2.1. PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS CONSIDERADOS

A todos los animales se les tomaron los siguientes parámetros morfométricos (figura 4a):

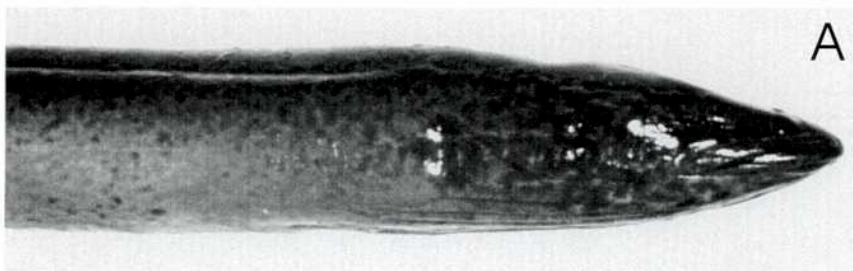
- ♦ **LT:** largo total, medido desde el extremo oral hasta el extremo caudal
- ♦ **LC:** largo de la cabeza, medido desde el extremo oral hasta el orificio opercular.
- ♦ **LEA:** largo espiráculo-ano, medido desde el orificio opercular hasta el orificio anal.
- ♦ **DMC:** diámetro máximo de la cabeza.
- ♦ **DC:** diámetro del cuerpo (dorso-ventral) a la altura del orificio opercular.
- ♦ **PT:** peso total en gramos.
- ♦ **PG:** peso de la gónada en gramos.
- ♦ **IGS:** índice gonadosomático. (peso gónada/peso total X 100)
- ♦ **forma de la cabeza.** N: normal, A: aguzada (figuras 4b y c)
- ♦ color y patrón de manchas presentes en el cuerpo (librea).
- ♦ estado general y sanitario del ejemplar en el momento de la disección.
- ♦ extracción y conservación de los otolitos para su posterior estudio.
- ♦ extracción del cerebro e hipófisis.

Figura 4: Aspectos morfológicos de la anguila criolla. a) vista lateral general de la anguila criolla, indicando los diversos parámetros morfométricos considerados. LT: largo total; LC: largo de la cabeza; LEA: largo espiráculo-ano; DMC: diámetro máximo de la cabeza; DC: diámetro del cuerpo a la altura de la abertura opercular; b): cabeza de anguila tipo normal (N), c) cabeza de anguila tipo aguzada (A).

4a



4b)



4c)

4.2.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Se observó bajo microscopio estereoscópico la estructura macroscópica de los ovarios recién extraídos y se realizaron esquemas con cámara clara.

Oocitos vitelados de aproximadamente 3-4 mm fueron extraídos de ovarios bien desarrollados. Los oocitos fueron transparentados en una solución de etanol, formol y ácido acético (6:3:1)(Stoeckel y Neves, 1992) para observar la ubicación de la vesícula germinal.

MICROSCOPIA ÓPTICA

Las gónadas recién extraídas fueron pesadas, medidas y fijadas inmediatamente en líquido de Bouin durante 10-24 hs. (Martoja y Martoja Pierson, 1970; Bancroft & Stevens, 1990). Luego las mismas se pasaron a alcohol 70° para su conservación. Muestras de las regiones anterior, media y caudal de las gónadas, fueron incluidas en parafina (punto de fusión 54°-56°). Las muestras fueron cortadas en secciones de entre 5 y 12 μ m. dependiendo de la dureza del tejido y del estado de crecimiento de los oocitos. En los ovarios bien desarrollados, el citoplasma de los oocitos en etapas finales de la vitelogénesis, aparece ocupado por plaquetas vitelinas, cuya estructura y dureza hace que se desprendan fácilmente al realizar los cortes en el micrótopo y/o al ser desparafinados los cortes. Esto llega a imposibilitar la observación del material al microscopio. Esta dificultad se resolvió en forma parcial, cubriendo la superficie de corte de la muestra con una solución de colodión (0.6% de colodión en etanol 100° y éter etílico, proporciones 1:1) o con albúmina de Mayer (clara de huevo filtrada y glicerina en proporciones 1:1) (Martoja y Martoja Pierson, 1970) antes de cada corte.

Las secciones fueron teñidas con coloraciones histomorfológicas (Hematoxilina-Eosina, Tricómico de Masson, técnica Argéntica) e histoquímicas (PAS, Alcian Blue a pH 0.5, 1 y 4)(Pearse, 1985). Para el análisis de lípidos, se utilizaron muestras frescas y

otras fijadas y conservadas en formol 10% (pH 7). Estas últimas muestras se cortaron en crióstato a -12 °C y se colorearon con negro Sudan (Sudan Black B).

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Para microscopia electrónica de transmisión (MET) se extrajeron oocitos en varios estadios de desarrollo de ovarios frescos que se fijaron inmediatamente con Glutaraldehído al 2% en buffer Cacodilato 0.1 M (pH 7.2) durante 2 a 4 horas a 4°C. Las muestras fueron lavadas en buffer Cacodilato /sacarosa y post fijados en tetróxido de Osmio al 1%. Posteriormente fueron deshidratados e incluidos en resina sintética Epon 812. El material fue cortado con un ultramicrotomo Reichert y las secciones fueron observadas en un microscopio electrónico de transmisión marca Zeiss EM-109.

Para analizar la estructura de las membranas de recubrimiento del oocito con microscopio electrónico de barrido, porciones de ovario con oocitos de diversos tamaño fueron deshidratados gradualmente en etanol de gradación creciente, etanol 100°-acetona y acetona (tres cambios de 20 minutos c/u). Las muestras fueron secadas al aire y se les realizó punto crítico. Finalmente fueron montadas y metalizadas para su observación. Las muestras fueron analizadas en un microscopio electrónico JEOL JSM-25S II.

Se utilizaron oocitos en tres diferentes estadios de desarrollo: perinucleolar (vitelogénesis temprana), de vesículas y plaquetas vitelinas (vitelogénesis media) y oocitos ovulados.

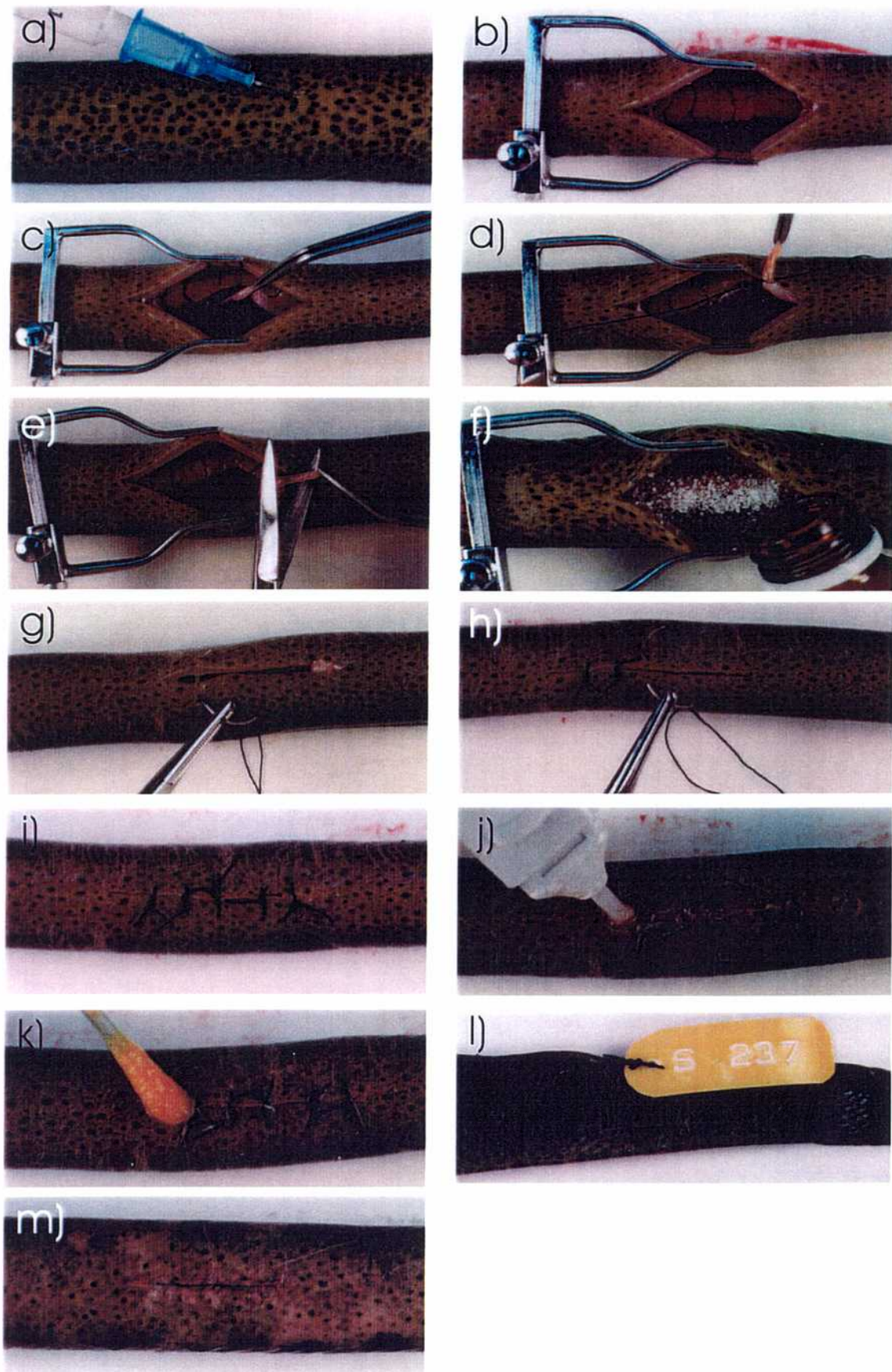
4.2.3. BIOPSIAS

Synbranchus marmoratus no presenta dimorfismo sexual externo. En aquellos casos en que fue necesario conocer el sexo y estado de desarrollo sexual sin sacrificar al animal, se realizaron biopsias de acuerdo con la siguiente técnica.

Los ejemplares fueron anestesiados, pesados y medidos de acuerdo al protocolo general. En la región ventral del cuerpo, aproximadamente a media distancia entre el ano y el espiráculo, se inyectaron 0.25 ml de anestésico local (clorhidrato de Procaína) y se realizó una incisión con bisturí a través de la pared del cuerpo de aproximadamente 1-3 cm. El intestino fue suavemente desplazado hasta dejar expuesta la porción cefálica de la gónada. La misma se sujetó con pinzas, se ligó con hilo de sutura a 1cm de su extremo (para evitar pérdida de fluidos) y se cortó con tijeras de punta fina cuidando de no dañar los vasos sanguíneos. En la cavidad abdominal abierta se colocó sulfa de tipo peritoneal, se suturó la incisión con hilo y aguja curva, se sellaron los bordes de la herida con pegamento instantáneo a base de Cianocrilato y se la recubrió con antibiótico (Rifocina). Los animales biopsados fueron identificados con marcas plásticas numeradas unidas por hilo de nylon a la región dorsocaudal. La secuencia fotográfica muestra el proceso en detalle (figura 5).

Una vez recuperados del efecto de la anestesia, se los colocó en recipientes con agua de clorada y azul de metileno como agente profiláctico, durante cuatro días sin alimentación para controlar su evolución. Pasado este periodo fueron llevados a una de las cajas descriptas en el punto 2.1.4. Las muestras de gónadas obtenidas fueron fijadas, conservadas y procesadas para su estudio histológico de acuerdo a la metodología descripta.

Figura 5: Método de biopsado de las gónadas: a) anestesia local; b) apertura de la cavidad abdominal a la altura de la región cefálica de la gónada; c) d) e) ligado y corte del tejido; f) colocación de cicatrizante de tipo peritoneal; g) h) i) sutura de la herida; j) sellado de la herida con pegamento a base de cianocrilato; k) hisopado con solución antibiótica, l) identificación del ejemplar con marcas plásticas; m) herida cicatrizada al cabo de 10 días.



4.2.4. ESCALA DE MADURACIÓN OOCITARIA

Cortes histológicos de ovarios con oocitos en distinto estado de crecimiento fueron medidos y caracterizados en el microscopio óptico a fin de confeccionar una escala de maduración en base a los siguientes parámetros (Selman y Wallace, 1986, 1989; Casadevall *et al*, 1993; Jackson y Sullivan, 1995; Tyler y Sumpter, 1996, Amiri *et al*, 1996):

- diámetro celular (medido en su punto más ancho).
- diámetro nuclear (medido en su punto más ancho).
- cantidad y ubicación de los nucleolos.
- características citoplasmáticas y nucleares
- características tintoriales de la célula.
- características de la/las membrana/s que recubre/n al oocito.
- capa de células foliculares y tecaes.
- grado de avance de la vitelogénesis.

4.2.5. OVIDUCTO Y ESTRUCTURA DE LA PAPILA UROGENITAL

Bajo microscopio estereoscópico se disecó la parte caudal del sistema reproductor a fin de observar la morfología de los conductos que conducen las gametas al exterior. Porciones caudales de ovarios, junto con la porción terminal del tubo digestivo, vejiga urinaria y toda la zona correspondiente al ano y papila urogenital se fijaron y procesaron para microscopía óptica. El material fue cortado en secciones de 15 μ m. Los cortes seriados fueron coloreados con tricrómico de Masson (Pearse, 1985).

4.2.6. DINÁMICA OVÁRICA

Con el objeto de conocer la dinámica de las diferentes poblaciones de células sexuales presentes en el ovario, se llevaron a cabo conteos de los distintos estadios existentes en diversos momentos del año.

Se realizaron cortes histológicos de porciones anteriores, medias y posteriores de los ovarios, a fin de determinar la homogeneidad u heterogeneidad de la distribución de los diversos estadios celulares a lo largo del mismo.

Sobre el total de elementos celulares existentes en un número determinado de secciones de ovario, se calculó la proporción de células correspondiente a los estadios celulares considerados en la tabla de crecimiento oocitario. Debido a la gran diferencia en el tamaño de las células germinales en estadios iniciales respecto de los oocitos en estadios finales de vitelogénesis, los conteos debieron realizarse a diversos aumentos, a fin de poder contemplar toda la serie celular.

Arbitrariamente, se consideraron los siguientes periodos:

Enero - Febrero

Marzo - Abril

Mayo - Junio

Julio - Agosto

Septiembre - Octubre

Noviembre - Diciembre

Los resultados obtenidos fueron graficados y comparados con el índice gonadosomático de los ejemplares (IGS).

4.2.7. CENTROS MELANO MACROFAGICOS (CMM)

Para caracterizar estas estructuras en las gónadas, varios ejemplares de anguila criolla fueron anestesiados, pesados, medidos y procesados de acuerdo a la metodología descrita. Las gónadas disecadas fueron observadas, sin fijar, bajo lupa estereoscópica. Algunas muestras fueron congeladas a -20°C y otras fueron fijadas con formol 10% (pH7) y líquido de Bouin. Estas últimas fueron conservadas pasado el periodo de fijación 111 en alcohol 70° . Trozos de hígado y bazo fueron tratados de igual modo para ser utilizadas a modo de control positivo. Las muestras congeladas se cortaron a $10\text{-}15\text{ }\mu\text{m}$ y -12°C en crióstato y fueron coloreadas con tinciones específicas para lípidos. Las muestras fijadas se embebieron en parafina y cortes de $5\text{-}7\text{ }\mu\text{m}$ fueron coloreados con Hematoxilina -Eosina y con diversas técnicas histoquímicas tales como:

- Ácido Periódico de Schiff (PAS): para detectar glucosaminoglicanos neutros y lipofuscinas (Pearse, 1985).
- Técnica de Schmorl para lipofuscinas y melanina (Pearse, 1985).
- Long Ziehl-Neelsen para detectar lipofuscinas ácidas muy oxidadas (Bancroft & Stevens, 1990).
- Negro Sudan B (Sudan Black B) para lipofuscinas tempranas o poco oxidadas y lípidos en general (Bancroft & Stevens, 1990).
- Exposición a luz ultravioleta para detectar autofluorescencia de lipofuscinas (Pearse, 1985).
- Técnica de Masson-Fontana para melanina (Pearse, 1985).
- Técnica de hierro ferroso (Ferrous iron) para melanina y hemosiderina (Pearse, 1985).

TINTA CHINA COMO INDICADOR DE LA ACTIVIDAD FAGOCÍTICA DE LOS MACRÓFAGOS

Una característica de los CMM es la propiedad de fagocitar partículas extrañas, debido a la capacidad fagocítica de algunos de los tipos celulares que lo componen. Para comparar dicha actividad entre los CMM típicos de bazo, hígado y riñón y las estructuras estudiadas en las gónadas, se llevó a cabo la siguiente experiencia.

A cuatro anguilas previamente anestesiadas, se les inyectó intraperitonealmente una solución de tinta china (negro de humo en solución acuosa) al 2% en solución de Holtfreter 0.1X. Veinticuatro horas después de la inyección, los animales fueron anestesiados, muertos y disecados, y las muestras de bazo, hígado, riñón y gónada, fueron fijadas y procesadas de acuerdo a la técnica histológica descrita (Nakamura *et al.*, 1992).

5. RESULTADOS

5.1. ANATOMIA DEL OVARIO

5.1.1. ANATOMIA MACROSCÓPICA

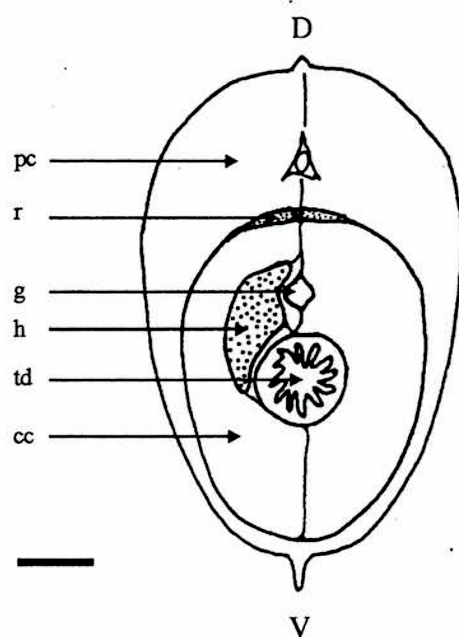
La cavidad general del cuerpo ocupa aproximadamente el 70% del mismo. En su interior se ubica el tubo digestivo, alargado y sin especializaciones evidentes. El hígado, también alargado, no presenta lobulaciones y se encuentra unido dorsolateralmente al tubo por medio de bridas de tejido conectivo. La vesícula biliar es conspicua y el bazo está bien desarrollado. Esta especie, como todos los Synbranchiformes, carece de vejiga natatoria. La gónada es alargada, cilíndrica, y a diferencia de la mayoría de los peces, impar. Está ubicada en posición dorsal, por debajo de los riñones (retroperitoneales) y se extiende a todo lo largo del cuerpo, desde el primer tercio del tubo digestivo hasta la papila urogenital, donde desemboca junto con la vejiga urinaria. El diámetro del orificio urogenital es muy pequeño y es posterior al ano. El ovario, cuya anatomía es homogénea en toda su longitud, se encuentra suspendido del techo de la cavidad por un mesovario dorsal. Ventrolateralmente se une al tubo digestivo por un mesovario ventral (figura 6).

Morfológicamente el ovario se compone de una vaina o envoltura que lo rodea totalmente. Dentro de ésta se desarrolla una lamela ovárica impar, que se dispone en forma de "U". Los extremos de la misma se unen firmemente a la envoltura, por dos bridas o conectores de tejido conectivo y muscular. Entre estas bridas y por la cara ventral, la superficie de la lamela se une a la vaina, por medio de un gran número de delgadas proyecciones conectivas fibrilares. La zona libre, delimitada dorsalmente por la envoltura y ventralmente por la lamela, constituye la cavidad ovárica o lumen ovárico (figura 7).

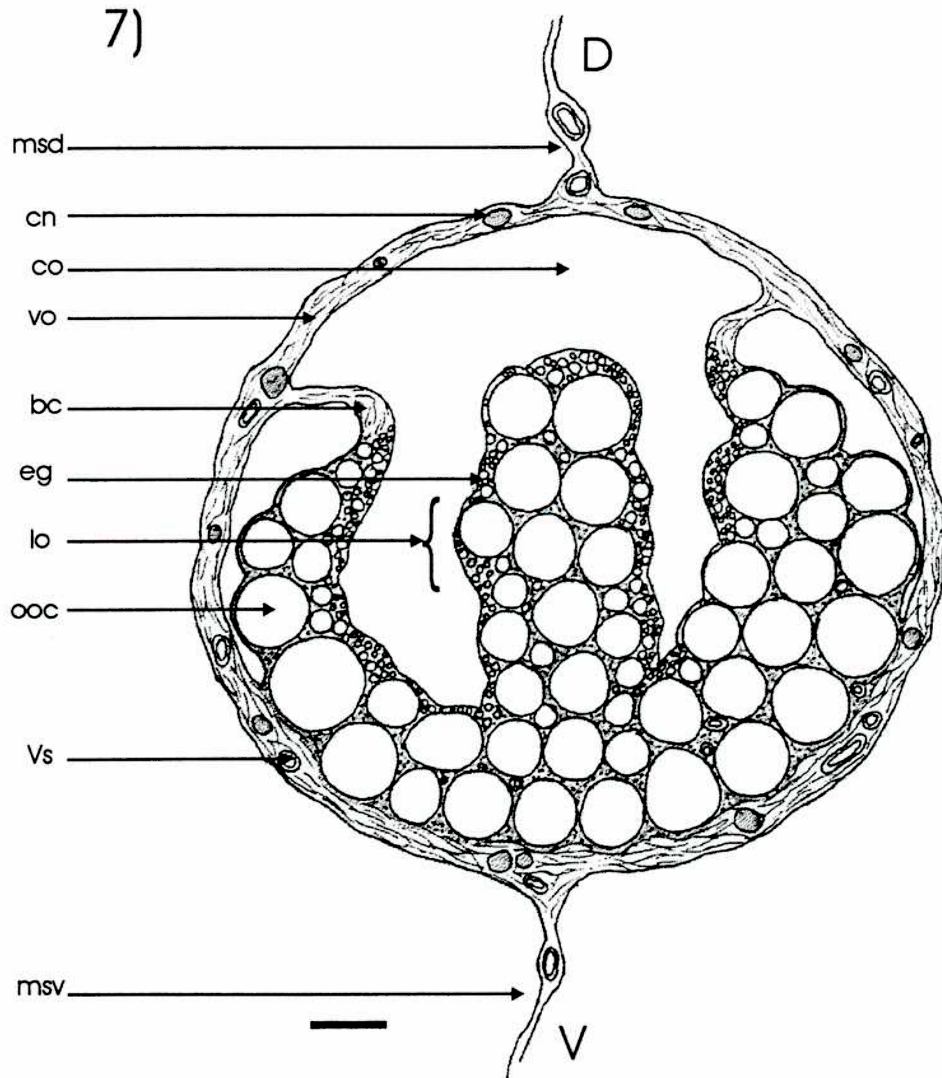
Figura 6: Esquema de corte transversal de una anguila a la altura de la gónada. cc: cavidad del cuerpo; g: gónada; h: hígado, pc: pared del cuerpo; r: riñones retroperitoneales; td: tubo digestivo. 2x.

Figura 7: Esquema de corte transversal de ovario. bc: bridas conectivas; cn: cordones nerviosos; co: cavidad ovárica; eg: epitelio germinal; lo: lamela ovárica; msv: mesovario; ooc: oocitos en desarrollo; vo: vaina ovárica; vs: vasos sanguíneos. 10x.

6)



7)



La lamela, a pesar de ser continua, sufre un repliegue o engrosamiento en su parte media ventral, que se proyecta hacia el techo del ovario (figura 7). Su superficie interna se halla recubierta por un epitelio, el epitelio germinal o luminal: Tanto interna como externamente, la lamela presenta algunas células pigmentadas de aspecto estrellado (melanóforos).

Es común encontrar, distribuidos al azar y principalmente en la cara externa de la lamela ovárica, corpúsculos de color marrón y estructura globular, que corresponden a las estructuras mencionadas en el punto 4.2.7 como centros melano-macrofágicos (CMM).

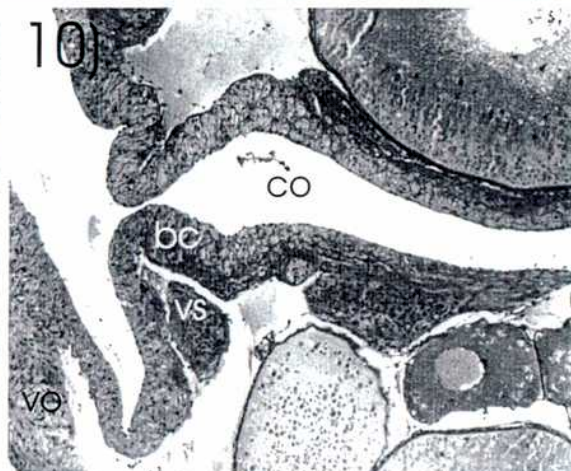
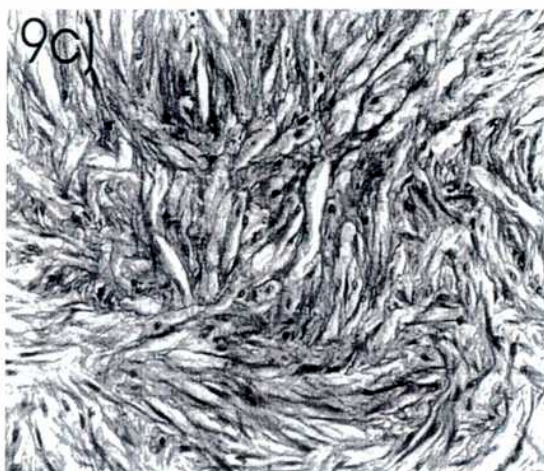
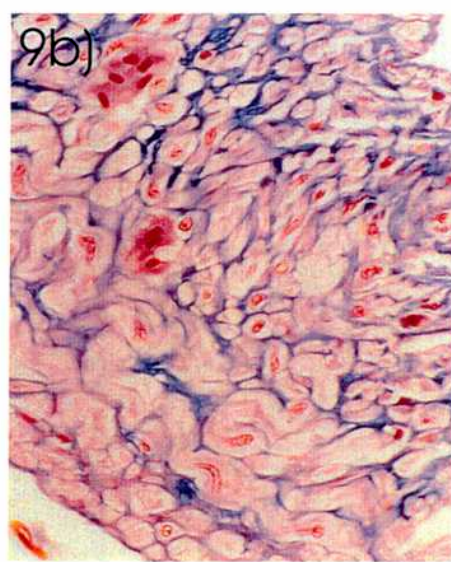
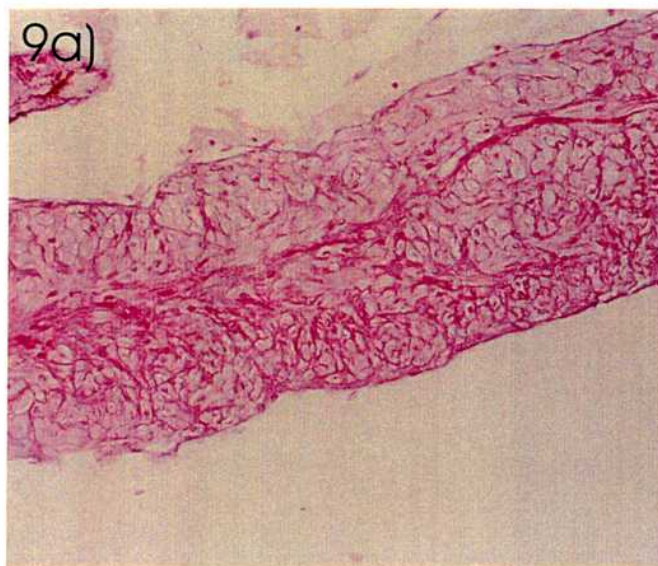
Las células germinales se distribuyen a lo largo del epitelio germinal, zona en donde se encuentran las células germinales primordiales, oogonias y los oocitos tempranos que acaban de iniciar la etapa de crecimiento. Los oocitos de mayor tamaño se ubican en la cara externa de la lamela, y se distribuyen en forma homogénea a lo largo del estroma. El diámetro o espesor de la lamela ovárica se modifica significativamente a lo largo del año en función del estado funcional y reproductivo de la gónada. Durante la etapa reproductiva, el diámetro es máximo, y la cavidad ovárica queda virtualmente colapsada por el gran tamaño de los oocitos (figuras 8a y b).

La irrigación del ovario es intensa, la vaina presenta una arteria gonadal principal, de posición dorsal, que se ramifica y proyecta por toda la superficie y por dentro de la lamela ovárica. En este lugar se ramifica hasta capilarizarse entre las células tecales de cada folículo, llevando oxígeno, nutrientes y hormonas a los oocitos.

Figura 8: Corte transversal de ovario inmaduro(a) y maduro (b). La cavidad ovárica se halla colapsada por el tamaño de los oocitos. En el ovario maduro, la vaina muscular se encuentra muy adelgazada por el gran diámetro del ovario. 5x.

Figura 9: Aspecto histológico de la vaina ovárica en corte transversal. a) y b) La disposición de las fibras musculares lisas parece definir dos capas musculares longitudinales (ext. e int.) y una capa circular media. c) detalle de las células musculares lisas en donde no se observan capas, sino que las fibras se hallan en direcciones muy variadas. a) hematoxilina-eosina. 100x, b) tricrómico de Masson. 400x, c) hematoxilina-eosina. 200x.

Figura 10: Bridas conectivas de unión de la lamela con la vaina ovárica. La estructura es la misma que la de la vaina muscular. Cuando se fusionan con la lamela, pierden su estructura muscular quedando solo tejido conectivo. bc: bridas conectivas; co: cavidad ovárica; ooc: oocito; vo: vaina ovárica; vs: vaso sanguíneo. 100x.



5.1.2. ANATOMÍA MICROSCÓPICA

ESTRUCTURA DE LA VAINA OVÁRICA

La vaina que envuelve a la gónada está formada principalmente por fibras musculares lisas y por tejido conectivo denso. Las fibras musculares lisas se encuentran dispuestas de forma muy irregular y parecen organizarse en capas de tamaño y espesor muy variable y con orientaciones muy diversas. A pesar de no observarse una demarcación entre las diferentes capas musculares pareciera que en términos generales la capa más externa se encuentra dispuesta en sentido longitudinal, y la más interna en sentido circular o helicoidal (figuras 9a, b y c). Las bridas que unen la lamela a la vaina ovárica, se originan como una continuación de esta última, y poseen fibras musculares lisas que van desapareciendo a medida que comienza a formarse el epitelio germinal y aparecen las células germinales (figura 10).

Las capas o fascículos musculares se encuentran separados entre sí por tejido conectivo con una cantidad de fibras colágenas poco común por su abundancia y por su disposición multidireccional.

La vaina está abundantemente irrigada por vasos sanguíneos y linfáticos de diverso calibre. Un mesotelio peritoneal plano la recubre externamente (peritoneo).

Incluidos en la vaina ovárica se pueden observar "cordones" formados por distintos tipos celulares dispuestos en sentido longitudinal (figuras 11a, b y c). Las técnicas histológicas ensayadas, coloración argéntica para identificar axones y Klüver-Barrera para identificar vaina de mielina, (Aldana *et al.*, 1996; Bancroft & Stevens, 1990) indicaron que se trata de nervios amielínicos. En su estructura se pueden identificar diversos tipos celulares; el de mayor tamaño, con núcleo redondo y prominente, nucleolo central y poca afinidad tintorial corresponde a cuerpos de neuronas ganglionares. Con menor tamaño, escaso citoplasma, núcleo ahusado y con cromatina más condensada, se observan las células de Schwann, ubicadas entre gran número de axones y fibras nerviosas, intensamente coloreadas (figuras 11d y e). Se pueden

identificar también núcleos de células satélite y abundantes núcleos de forma elíptica o plana, muy picnóticos, correspondientes a fibrocitos. Los fibrocitos se agrupan para formar el epimisio membrana que recubre externamente todo el nervio y el perimisio, que divide al nervio en porciones o paquetes (figura 11b). El endomisio, que recubre a cada axon, es difícil de observar a nivel óptico en el material estudiado.

ESTROMA OVÁRICO Y EPITELIO GERMINAL

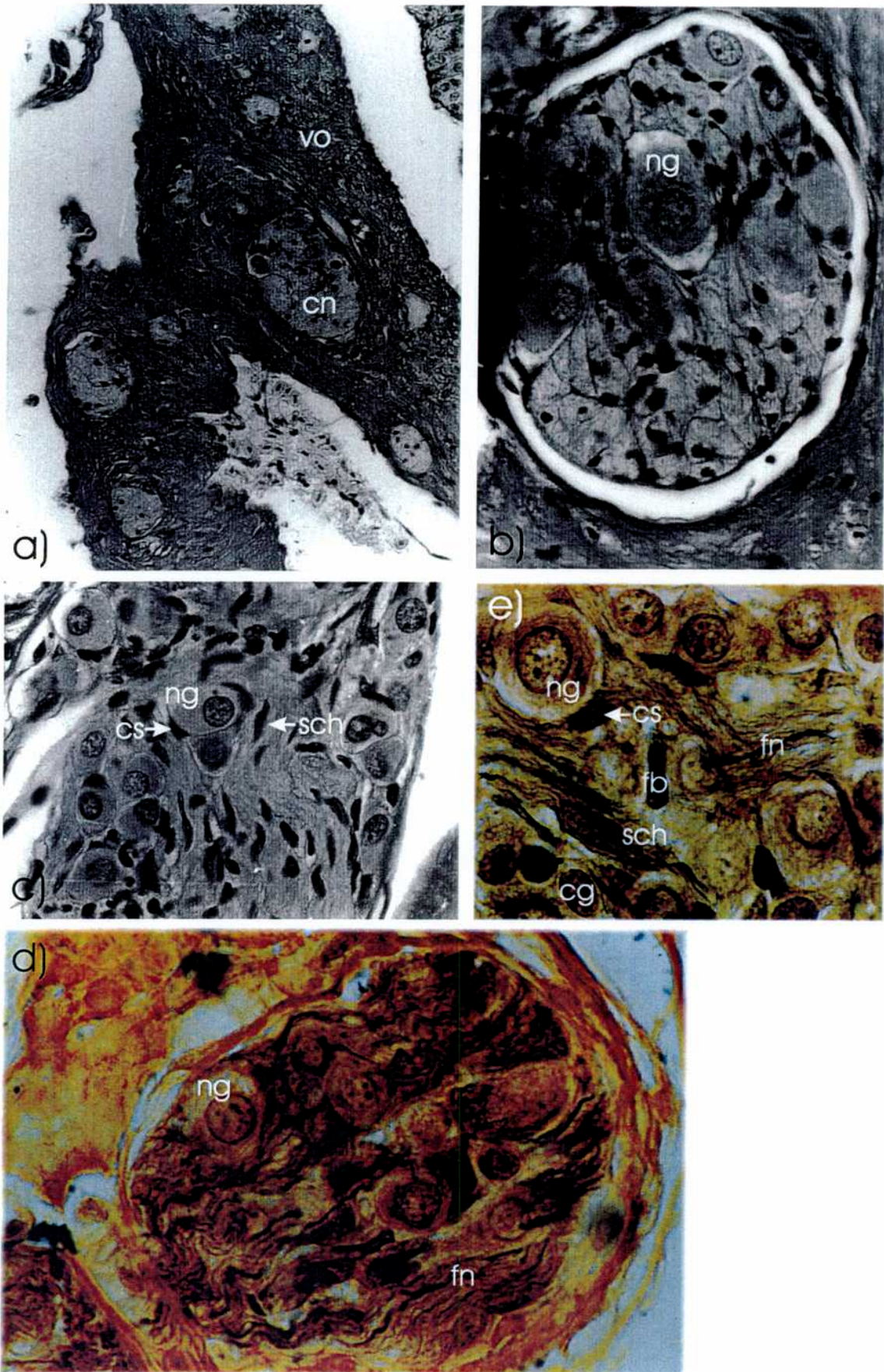
El estroma ovárico está constituido principalmente por una matriz de tejido conectivo denso con abundante irrigación sanguínea, vasos linfáticos, elementos glandulares y secretores y escasas fibras musculares lisas.

La lamela ovárica puede dividirse en dos zonas o regiones contiguas. La zona del epitelio germinal, que limita con la cavidad ovárica, y la zona de crecimiento y vitelogénesis, más desarrollada y que limita externamente con la vaina ovárica (figura 7). El epitelio germinal está constituido por células germinales (oogonias e incluso oocitos en etapas iniciales de crecimiento, detenidos en profase meiótica) y células somáticas. Estas células somáticas, pueden ser células epiteliales o células prefoliculares. Las últimas son consideradas precursoras de las células foliculares.

Los oocitos que inician su desarrollo se van desplazando a medida que crecen hacia el interior de la lamela ovárica. La formación del folículo es temprana y se produce en el epitelio germinal.

Se han identificado dos capas o envolturas celulares del folículo. La de células tecales, monoestratificada plana simple y, separada por una membrana basal muy conspicua, una capa de células foliculares de estructura plano-cúbica, interna y en íntimo contacto con la membrana plasmática del oocito (figura 14a). Inmersos en el estroma de la lamela, se observan estructuras globulares descritas como CMM. Histológicamente están formados por un cúmulo de células con núcleo pequeño y picnótico y citoplasma granulado y vacuolado, cuya estructura y función se detallan más adelante.

Figura 11: Cordones nerviosos amielínicos de la vaina ovárica. a) Aspecto de la porción dorsal de la vaina ovárica con varios nervios de diverso calibre. 100x. b) y c) detalles de nervios en corte transversal y longitudinal respectivamente. 400x. d) corte transversal de nervio con tinción de plata. 400x. e) detalle de una sección de nervio con tinción de plata. 1000x. cn: cordón nervioso; cs: núcleo de célula satélite; fb: núcleo de fibrocito; fn: fibras nerviosas amielínicas; ng: neurona ganglionar; sch: núcleo de célula de Schwann; vo: vaina ovárica.



5.1.3. OVIDUCTO Y ESTRUCTURA DE LA PAPILA UROGENITAL

No se ha identificado ninguna estructura homologable a un oviducto propiamente dicho. La cavidad ovárica es el único espacio por el cual los oocitos ovulados y reunidos en este espacio, alcanzarían el exterior. En su porción más caudal, la cavidad se estrecha hasta unirse al conducto urinario, formando un corto conducto urogenital que desemboca en la papila urogenital, detrás del ano. El diámetro de la papila es muy pequeño y se encuentra en general colapsado lo que dificulta su observación. En animales con ovarios maduros, en cambio, la región urogenital se edematiza, enrojece y se hace más evidente (figura 12).

5.2. OOGENESIS

5.2.1. ETAPAS DE LA OOGÉNESIS Y ESCALA DE MADURACIÓN

Utilizando criterios similares a los de varios autores (Cussac y Maggese, 1986; Horvath, 1986; Agostinho *et al*, 1987; Wallace y Selman, 1990, Srivastava y Singh, 1990, Tyler y Sumpter, 1996, Grier, 1999), basados en propiedades fisiológicas, bioquímicas, morfológicas, embriológicas e histológicas, se construyó una escala discreta de crecimiento oocitario con el objeto de caracterizar las etapas de la oogénesis en *S. marmoratus*.

- **OOGONIAS (OOG)**

Las oogonias se distribuyen entre las células epiteliales que bordean la cavidad ovárica de la anguila, formando el epitelio germinal (EG). Las oogonias pueden dividirse mitóticamente durante toda la vida del animal, repoblando el ovario de células germinales. En este caso continúan ubicándose a lo largo del EG, pudiendo permanecer aisladas (OOGa) o formando nidos o grupos de oogonias (OOGn).

Una vez que la oögonia inicia el proceso de meiosis, las células epiteliales que la acompañan terminan de envolverla y ambos tipos celulares se hunden en el estroma ovárico. Las células epiteliales vecinas no involucradas se superponen a las prefoliculares separándolas de la cavidad ovárica y reconstituyendo la integridad de la membrana basal del EG. En este momento la célula germinal deja de ser una oögonia para transformarse en un oöcito y las células prefoliculares que lo acompañan se transforman en células foliculares (Grier, 1999). La membrana basal del epitelio germinal separa al EG del folículo en formación

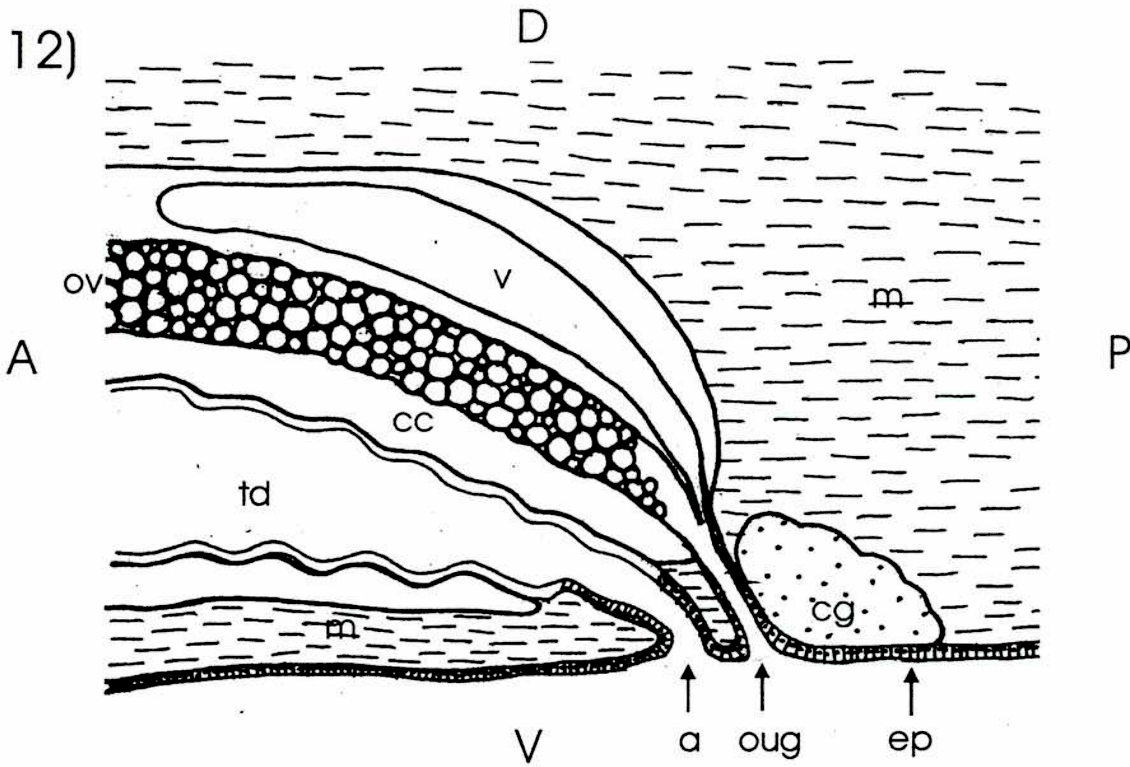
La figura 13 resume la renovación de oögonias por mitosis y la foliculogénesis y crecimiento primario de los oöcitos. La foliculogénesis se inicia cuando una oögonia entra en leptotene de la primer profase meiótica.

Las OOG en general poseen un núcleo grande, típicamente ovoide, con cromatina finamente granulada o formando grumos de aspecto puntillado y un único nucleolo grande y de posición central. El citoplasma es escaso, con poca afinidad tintorial a la eosina, escaso retículo endoplasmático, numerosas mitocondrias y puede presentar agregados de material granular polimórfico, conocido comúnmente como "nuage" y considerado exclusivo de las oögonias (Grier, 1999). El diámetro celular varía entre 15 y 23 μm y el nuclear entre 8 y 16 μm . Se observan numerosas figuras mitóticas en este estadio celular (figura 14c). Las OOGn se observan formando grupos o cúmulos celulares que, en secciones de 7-10 μm , contienen de 8 a 10 células (foto 14b). Las OOGa presentan una relación núcleo/citoplasma levemente mayor que el de las OOGn, aunque las diferencias encontradas no son significativas

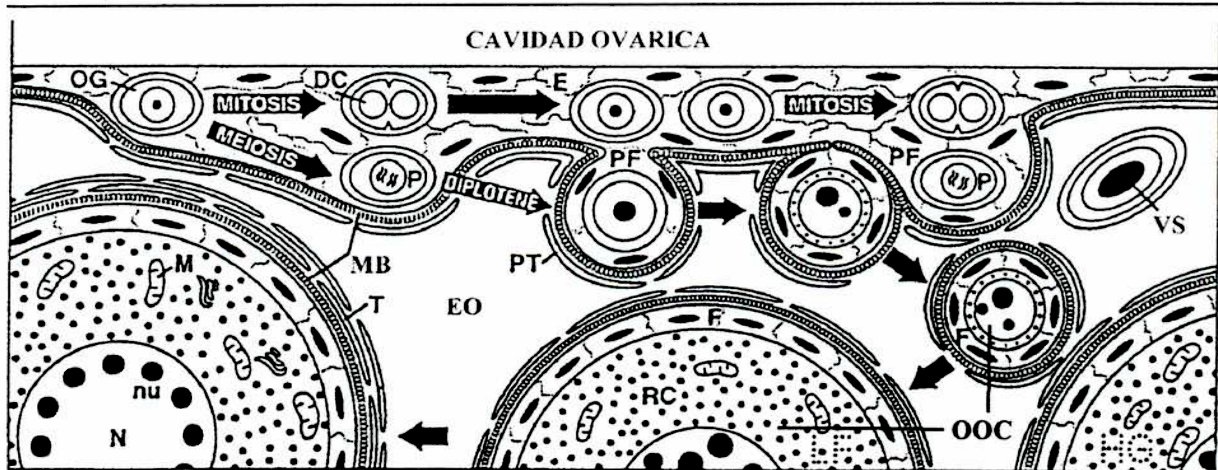
Entre las OOG se pueden observar células con citoplasma muy delgado y poco evidente y núcleos pequeños y picnóticos, pertenecientes a las células prefoliculares. En el caso de las OOGa el número de células prefoliculares es muy bajo (una o dos células), mientras que en las OOGn se observa un incremento del número. En todos los casos, ambos tipos celulares limitan con la cavidad ovárica, y están separados del resto de la lamela por una membrana basal continua.

Figura 12: Esquema de corte sagital de la papila urogenital mostrando la porción caudal del tracto genital. a: ano; cc: cavidad celómica; cg: cuerpo graso; ep: epidermis; m: músculo esquelético; oug: orificio urogenital; ov: ovario; td: tubo digestivo; v: vejiga urinaria.

Figura 13: Esquema de una porción de la lamela ovárica, mostrando la formación y desarrollo del folículo ovárico en el epitelio germinal. E: epitelio gerinal; EO: estroma ovárico; F: capa folicular; MB: membrana basal; N: núcleo del oocito; un: nucleolos; OG: oogonia; OC: oocito; P: oocito en paquitene; PF: células prefoliculares; PT: células pretecales; T: capa tecal; VS: vaso sanguíneo.



13)



Adaptado de Grier, 1999

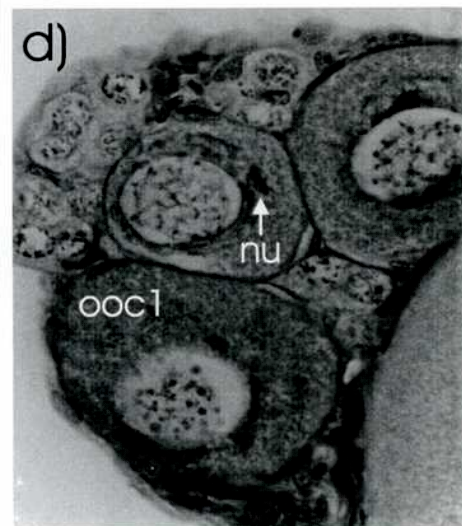
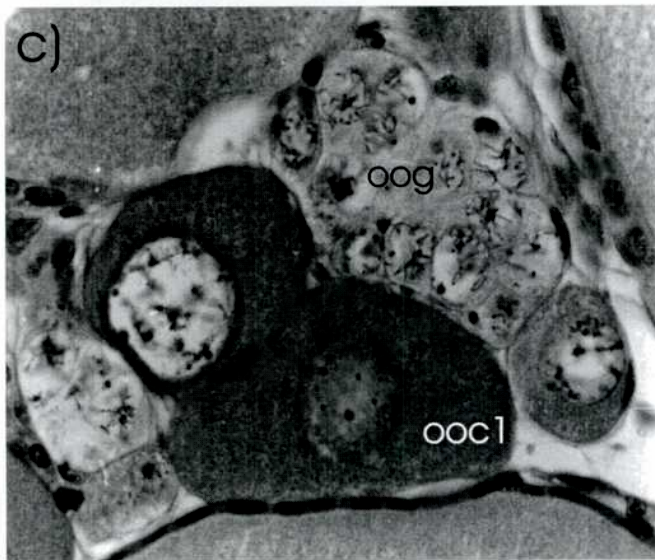
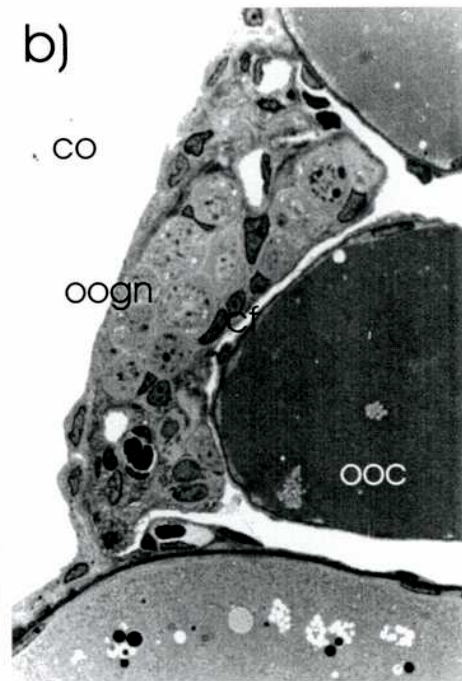
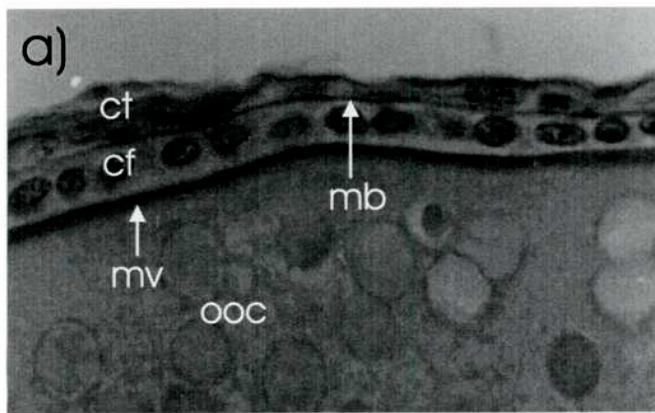
OOCITOS 1 (OOC1), ESTADIO PERINUCLEOLAR O DE CRECIMIENTO PRIMARIO

Una vez que el oocito se separa, junto con su capa de células foliculares, del epitelio germinal, la membrana basal del epitelio, se escinde, quedando el folículo recién formado rodeado por la membrana basal de su capa folicular y el EG con su membrana basal. Simultáneamente del estroma ovárico se diferencia un grupo de células somáticas que formarán la capa de células tecales (figura 13). El periodo de crecimiento primario se comienza con el inicio de la meiosis y la conformación del folículo. Es el periodo durante el cual se incrementa significativamente la cantidad de citoplasma y de organelas citoplasmáticas dentro del oocito. La figura 14a muestra los diversos elementos que conforman el folículo ovárico

Los OOC1 son células de forma redondeada, con citoplasma fuertemente basófilo, debido a la gran acumulación de ARN citoplasmático. El núcleo es típicamente redondo, grande y con la cromatina difusa o de aspecto puntillado. Puede tener de uno a varios nucleolos grandes que se distribuyen en forma homogénea en el carioplasma y en su periferia (figura 14). Los diámetros citoplasmáticos varían entre 25 y 150 μm y los nucleares entre 22 y 58 μm .

Las células foliculares forman una capa continua en torno del oocito, rodeándolo en su totalidad. Son de forma plana o plano cúbica y el citoplasma es visible. En etapas finales de este estadio comienza a formarse entre el oocito y las células foliculares una membrana acelular, conocida como membrana vitelina o zona radiata. Desde su inicio da una reacción positiva a la coloración de Schiff (PAS). A medida que el oocito crece, la membrana se va engrosando y su estructura se va modificando, aunque mantiene en todo momento la reactividad positiva al PAS.

Figura 14: a) Disposición de los diferentes elementos que componen el folículo ovárico. b) corte semifino de lamela ovárica a nivel del epitelio germinal, mostrando un nido de oogonias con células foliculares periféricas. 600x. c) nidos de oogonias en proliferación mitótica. 600x. d) oocitos en estadio de crecimiento primario (OOC1). Se observa la cromatina todavía parcialmente condensada y nuage perinuclear. 600x. cf: célula folicular, co: cavidad ovárica, ct: célula tecal; mb: membrana basal; un: nuage; ooc: oocito; oogn: nido de oogonias.



OOCITOS 2 (OOC2): ESTADIO DE ALVEOLOS CORTICALES

En los OOC2, el citoplasma presenta menor afinidad tintorial a los colorantes ácidos. Los diámetros celulares y nucleares de los OOC2 están comprendidos entre 140-360 μm ; y 40-100 μm respectivamente (figura 15a). Aunque el núcleo es grande la relación núcleo/citoplasma disminuye progresivamente con el aumento del tamaño celular. Los nucleolos, pequeños pero numerosos, se hallan ubicados en la parte periférica, muy cerca de la membrana nuclear, que en este estadio presenta un contorno irregular a modo de festón. La cromatina es difusa y se distribuye en forma homogénea por todo el núcleo (figura 15b). Se hace visible el núcleo vitelino como un corpúsculo conspicuo, muy basófilo y cuyo diámetro varía entre 8 y 24 μm (figura 15a). El núcleo vitelino, o cuerpo de Balbiani, es un complejo formado por una población heterogénea de organelas citoplasmáticas incluyendo mitocondrias, cuerpos multivesciculares, retículo endoplasmático, aparato de Golgi, así como material fibrogranular (Tyler y Sumpter, 1996).

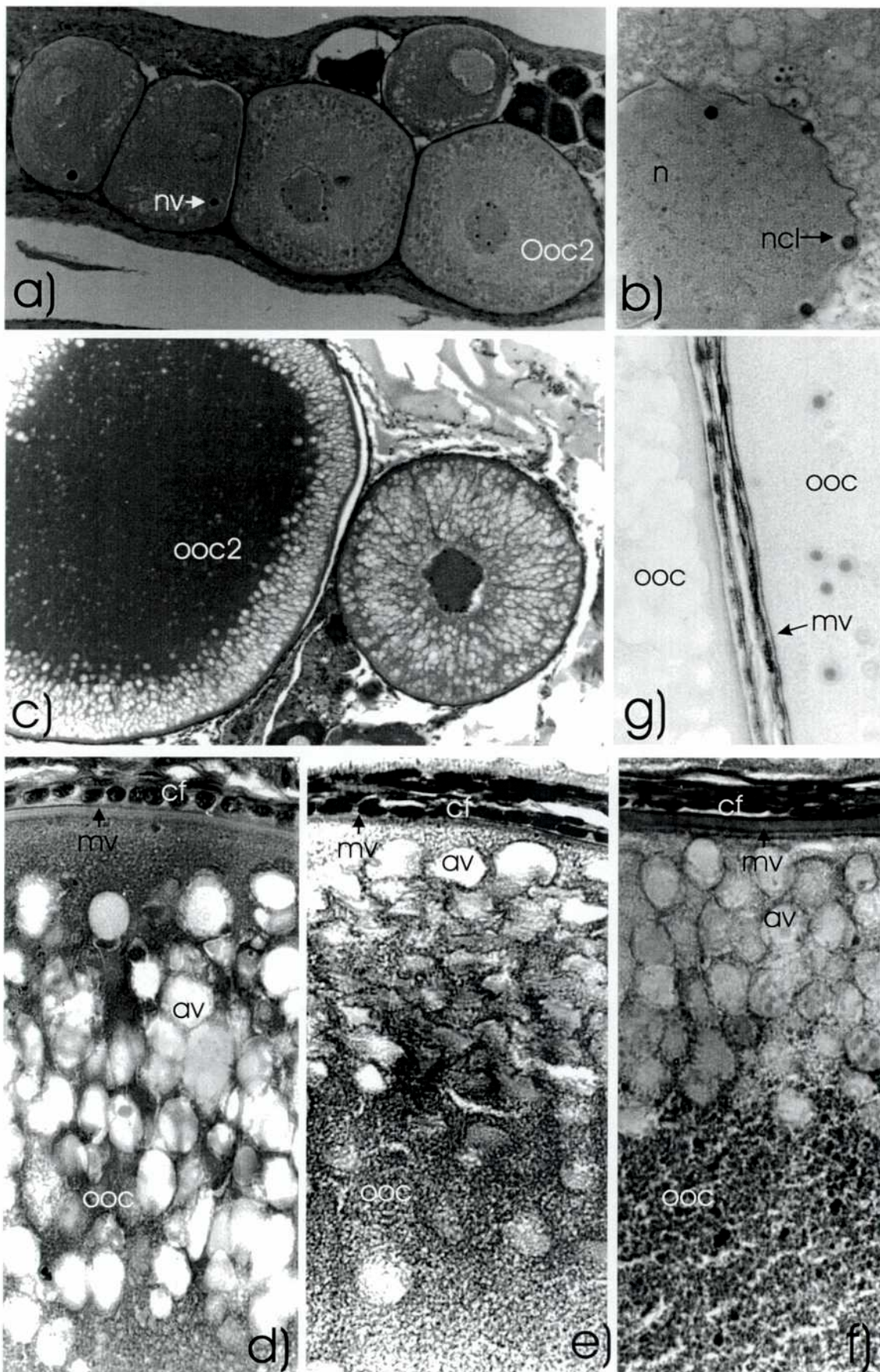
Dentro del citoplasma aparecen los alvéolos corticales (Tyler & Sumpter, 1996; Selman *et al*, 1986) (figura 15c). Exceptuando al núcleo vitelino, estas son las primeras estructuras dentro del oocito que pueden ser distinguidas al microscopio óptico y que aparecen como vacuolas o lagunas vacías (figura 15c). En un primer estadio, se pueden observar en la zona periférica del oocito, justo debajo de la membrana plasmática. A medida que aumentan en número, van ocupando todo el citoplasma del oocito para finalmente quedar restringidos nuevamente a la zona periférica (figura 15d, e, f). Su composición ha sido bien estudiada y contendrían principalmente polisialoglicoproteínas de alto peso molecular. En los OOC2 de mayor tamaño, los alvéolos corticales aumentan significativamente en número y tamaño llegando a fusionarse entre sí.

Las células foliculares no evidencian cambios en su morfología, aunque continúan aumentando en número acompañando el crecimiento del oocito. La membrana vitelina aparece como una delgada banda PAS positiva entre la membrana plasmática del oocito

y las células foliculares. Su estructura, al microscopio óptico es homogénea y mide entre 1,5 y 3 μm de espesor (figura 15g).

Durante este estadio, es común observar en la zona central del citoplasma del oocito, la presencia de inclusiones lipídicas, cuya densidad aumenta con el crecimiento del mismo. Histológicamente son difíciles de diferenciar de los alvéolos corticales, porque aparecen como vacuolas vacías. Dichas inclusiones contribuyen gracias a su contenido de carotenoides, a dar la típica coloración amarillo-anaranjado a los ovarios en desarrollo.

Figura 15: Oocitos en estadio de alvéolos corticales (OOC2). a) oocitos en estadios iniciales de crecimiento, mostrando el núcleo vitelino y pocos alvéolos corticales. 100x. b) detalle de la zona nuclear en donde se observa la membrana nuclear muy replegada, los nucleolos de posición periférica y algunos alvéolos corticales. 400x. c) oocitos en distintas etapas de acumulación de alvéolos corticales. 100x. d. e. f) detalle de región cortical de oocitos en donde se aprecia el gradual desplazamiento hacia la periferia de los alvéolos corticales. 400x. g) imagen de dos oocitos contiguos en donde se aprecia la existencia de tecas individuales. 600x. av: alveolos corticales; cf: célula folicular; co: cavidad ovárica; ooc: oocito en crecimiento; ooc1: oocito en crecimiento primario; ooc2: oocito en estadio de alvéolos corticales; oogn: nidos de oogonias; mb: membrana basal; mv: envoltura vitelina; ncl: nucleolo; nv: núcleo vitelino.



OOCITOS 3 (OOC3): VITELOGÉNESIS

La vitelogénesis es el principal evento responsable del enorme crecimiento del oocito, llegando en algunos teleósteos a representar más del 95% de su contenido citoplasmático (Tyler, 1991).

Durante este estadio, el citoplasma de los OOC3s comienza a acumular las sustancias de reserva (vitelogenina) en forma de estructuras de aspecto cristalino, las plaquetas vitelinas (PV) (figuras 16a y b). En el núcleo la cromatina continúa difusa y la acidofilia se incrementa. A medida que el oocito crece las plaquetas vitelinas ocupan todo el citoplasma y continúan desplazando los alvéolos corticales hacia la periferia del citoplasma, hasta quedar limitados a una delgada región por debajo de membrana vitelina (figuras 16c y d). La capa de células foliculares continúa monoestratificada, con núcleos planos o ligeramente cúbicos. La capa de células tecales no parece variar su estructura y permanece como un epitelio plano simple (figura 17b).

En etapas avanzadas de este estadio, el citoplasma de los oocitos se encuentra totalmente ocupado por plaquetas vitelinas de diverso tamaño. Estas son esféricas y en algunos casos poligonales, debido a la deformación que sufren por el contacto mutuo y la presión entre ellas. Las de ubicación periférica son de menor tamaño que aquellas centrales (30-40 μm y 70-80 μm respectivamente) (figura 17a).

La membrana vitelina se hace más ancha llegando a medir hasta 11 μm de espesor y presenta al microscopio óptico una estriación en sentido radial que corresponde a los poros canales por donde se conectan las microvellosidades del oocito y de las células foliculares (figura 17b).

El núcleo y el núcleo vitelino son difíciles de observar debido a la enorme cantidad de plaquetas vitelinas presentes. En los casos en que es posible observarlo, el núcleo se halla desplazado hacia la periferia (migración de la vesícula germinal), y su diámetro se mantiene próximo a los valores del estadio anterior (figura 17c). El diámetro celular continúa aumentando rápidamente debido a la continua acumulación de vitelo que se lleva a cabo, alcanzando valores de 4 mm.

Figura 16: Oocitos en estadio de vitelogénesis (OOC3). a) oocitos en vitelogénesis inicial, con pocas plaquetas vitelinas en la región periférica, gran cantidad de alvéolos corticales en la región pericitoplasmática y el centro del citoplasma ocupado por gotas lipídicas y glóbulos de vitelo. 100x. b) oocitos en estadio de vitelogénesis media, con la región central del citoplasma ocupado por plaquetas vitelinas. 100x. c) y d) detalles del empaquetamiento de los alvéolos corticales en la zona cortical por presión de las plaquetas vitelinas (PAS-Alcian blue) 600x. av: alvéolos corticales; gl: gotas de lípidos; mv: envoltura vitelina; n: núcleo; ooc2: oocito en estadio de alvéolos corticales; ooc3: oocito en vitelogénesis; pv: plaquetas vitelinas.

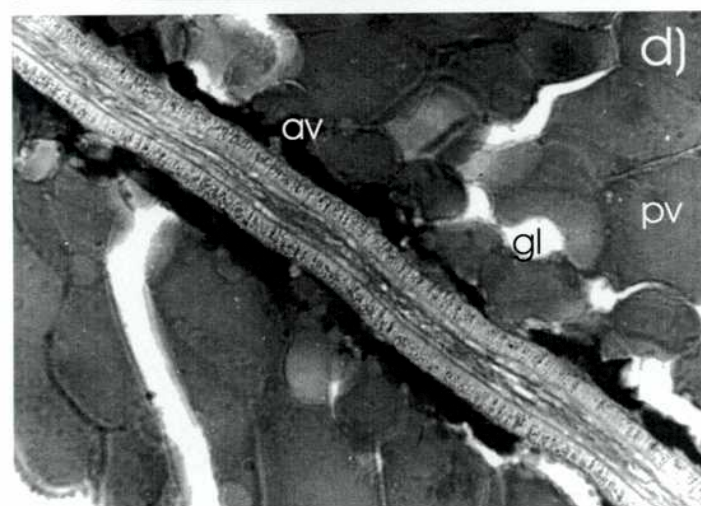
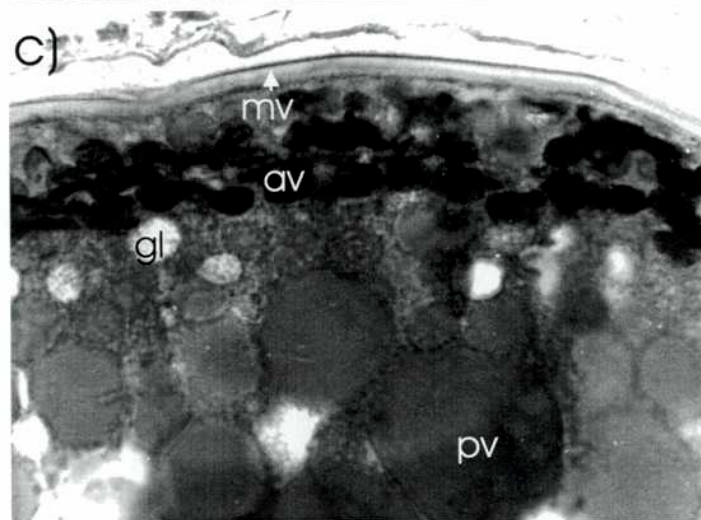
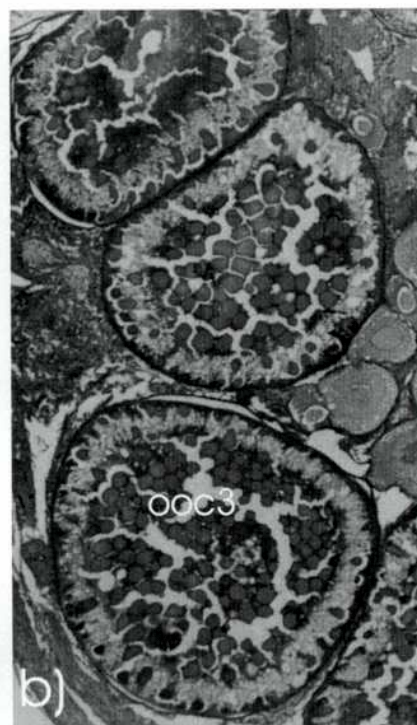
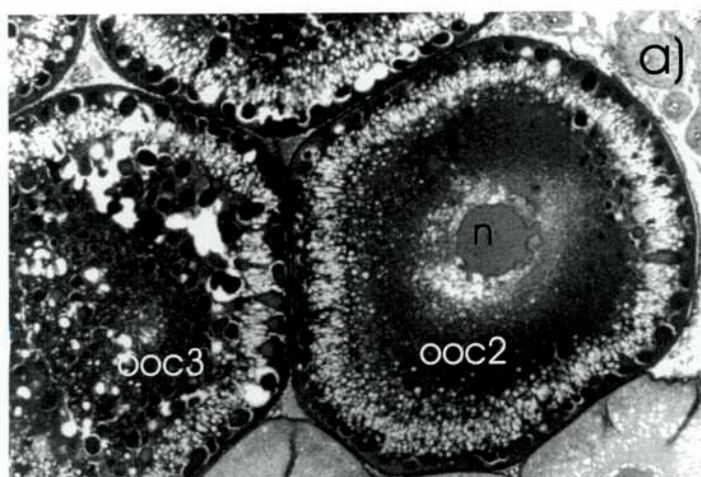
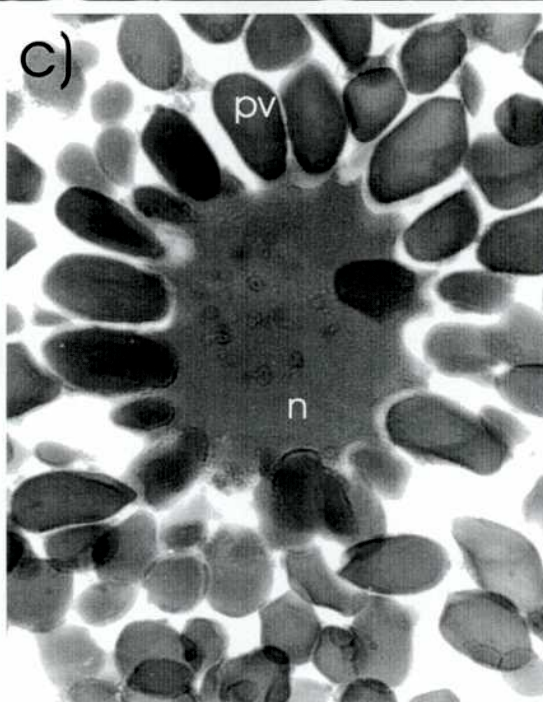
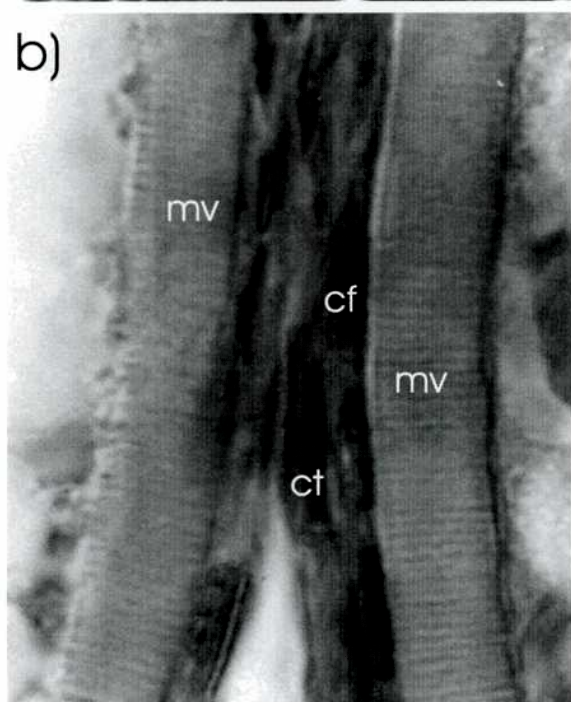
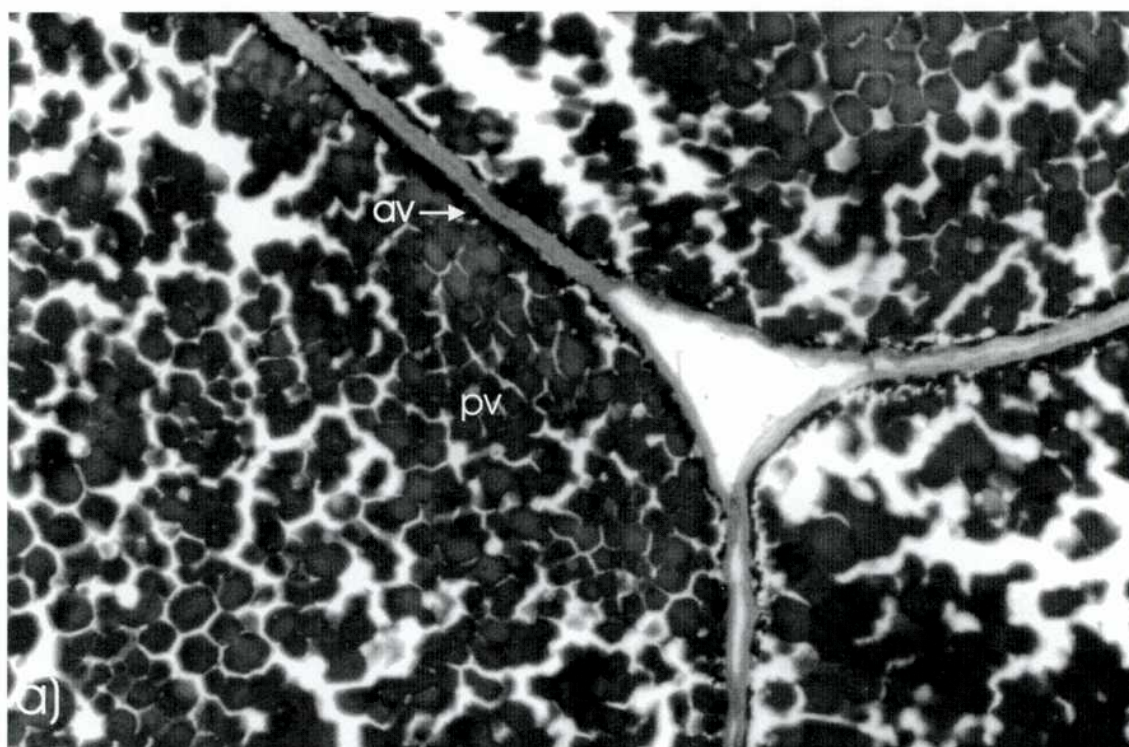


Figura 17: OOC3 en vitelogénesis final. a) El citoplasma se encuentra totalmente ocupado por plaquetas vitelinas y los alvéolos corticales se encuentran pegados a la membrana plasmática del oocito. 100x. b) detalle de la envoltura vitelina bien desarrollada, en donde se aprecia su estructura estriada, y las cpas folicular y tecal. 1000x. c) detalle del núcleo en donde se aprecian los cromosomas detenidos en profase de la primera división meiótica. 200x. av: alvéolos corticales; cf: células foliculares; mv: envoltura vitelina; n: núcleo; pv: plaquetas vitelinas.



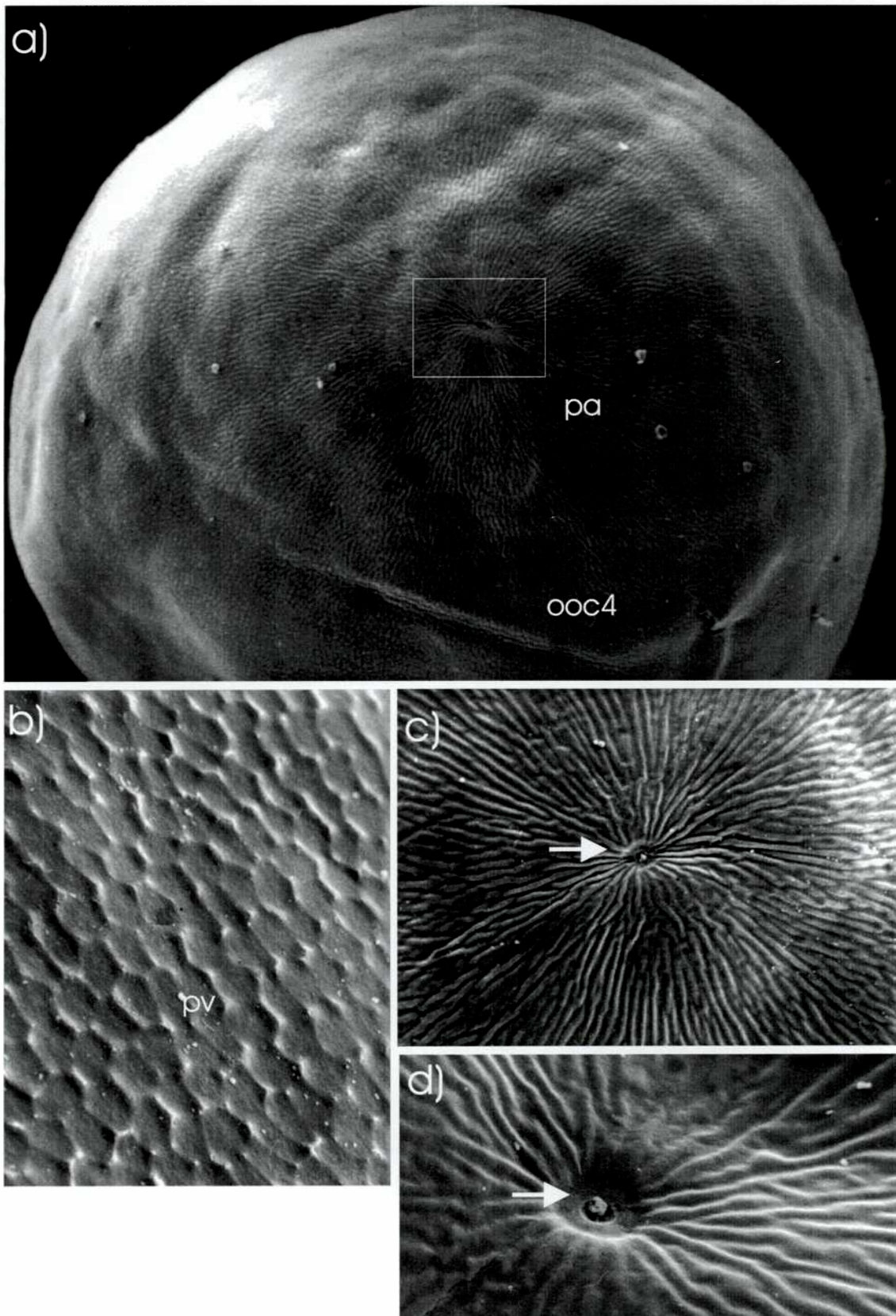
OOCITOS 4 (OOC4): OOCITOS OVULADOS.

Este estadio describe a los oocitos ovulados. El diámetro promedio de los mismos (muy homogéneo) es de 4 mm. Los cortes histológicos observados al microscopio óptico no permiten diferenciar más que la membrana vitelina bien desarrollada, debido a la gran cantidad de vitelo presente. Todo el citoplasma está ocupado por plaquetas vitelinas y ya no se observa la vesícula germinal. Por otra parte la gran dureza de las plaquetas vitelinas, hace prácticamente imposible la realización de cortes histológicos.

La observación de estos oocitos con microscopio estereoscópico, permitió identificar el micropilo. Este aparece como una pequeña abertura a modo de perforación sobre la superficie del huevo, no se observa ningún tipo de estructura o depresión que lo rodee (embudo o cono del micropilo).

Las observaciones realizadas con microscopio electrónico de barrido, muestran la superficie de la membrana vitelina de aspecto coriáceo (figura 18a). Sobre la misma se desarrollan de manera uniforme una serie de procesos o proyecciones irregulares que en la zona vegetativa del oocito, tienen aspecto de placas poligonales (figura 18b) que se van modificando hacia el polo animal tomando la forma de crestas de disposición aislada. En la zona más cercana al polo animal, las crestas se van uniendo delimitando estructuras que asemejan canales (figura 18c). Estos últimos se disponen en forma radial y levemente espiralada, y terminan en el micropilo (figura 18d).

Figura 18: Oocitos ovulados observados al microscopio electrónico de barrido (MEB). a) aspecto general de un oocito ovulado. Se observa el micropilo y la superficie de la envoltura vitelina. barra: 2cm. b) detalle de la envoltura vitelina en la región del polo vegetativo. Se observa la superficie en forma de placas poligonales. Barra: 100µm. c) detalle de la envoltura vitelina en la zona del polo animal, mostrando la superficie con crestas acanaladas que convergen en el micropilo. barra: 100µm. d) detalle del aparato micropilar. Se observa como los canales de la envoltura vitelina convergen en el embudo del micropilo. Barra 50µm. flecha: micropilo, pv: polo vegetativo; pa: polo animal; ooc4: oocito ovulado.



OOCITOS ATRESICOS Y ATRESIAS FOLICULARES

Como estructuras atrésicas presentes en el ovario de la anguila criolla, fueron considerados los siguientes tipos celulares: 1) oocitos en desarrollo que pasada la época reproductiva, no han sido ovulados y sufren fenómenos de regresión; 2) folículos ovulados (capa de células tecales y foliculares) y 3) oocitos en distintas etapas de desarrollo remanentes en la gónada durante el proceso de reversión sexual.

Existe un número indeterminado de oocitos en distintas etapas de crecimiento y vitelogénesis que por diversos motivos, no son ovulados y comienzan a evidenciar procesos de regresión celular. El número de oocitos que sufre este proceso es muy variable y es un fenómeno natural en todos los peces teleósteos (figuras 19a, b y c).

El proceso de regresión celular es similar para los tres tipos de atresias descriptas y se desarrolla según el siguiente mecanismo: Los primeros cambios evidenciables, involucran a la capa de células foliculares. Estas células que normalmente presentan un tipo estructural plano-cúbico, sufren una modificación sustancial de su morfología, y van tomando aspecto columnar alto (figura 20a). El citoplasma de las células foliculares se vacuoliza debido al desarrollo de fagosomas que contienen elementos celulares residuales y gránulos de vitelo, que comienzan a degradarse (figura 20b). En etapas más avanzadas de este proceso, las células foliculares se separan de la membrana basal y van metiéndose dentro del oocito que comienza de esta forma a fragmentarse. De esta manera las células foliculares se transforman en células fagocíticas que se ven implicadas directamente en la reabsorción primaria del oocito.

Al observar un corte histológico del ovario con iluminación de fluorescencia, las figuras atrésicas se destacan por presentar una intensidad muy marcada. Las plaquetas vitelinas en oocitos normales, presentan autofluorescencia color verde claro al usar filtro BV (400-440 nm). En oocitos que han iniciado procesos de regresión puede observarse como la fluorescencia inicial es muy intensa y de color naranja (figura 20c y d). A medida que la degradación avanza, la intensidad va disminuyendo progresivamente (figura 20e).

Figura 19: a), b) y c) Ovarios con distintas atresias foliculares. ooc: oocito; foa: folículo ovulado en atresia; fa: folículo no ovulado atrésico. 200x

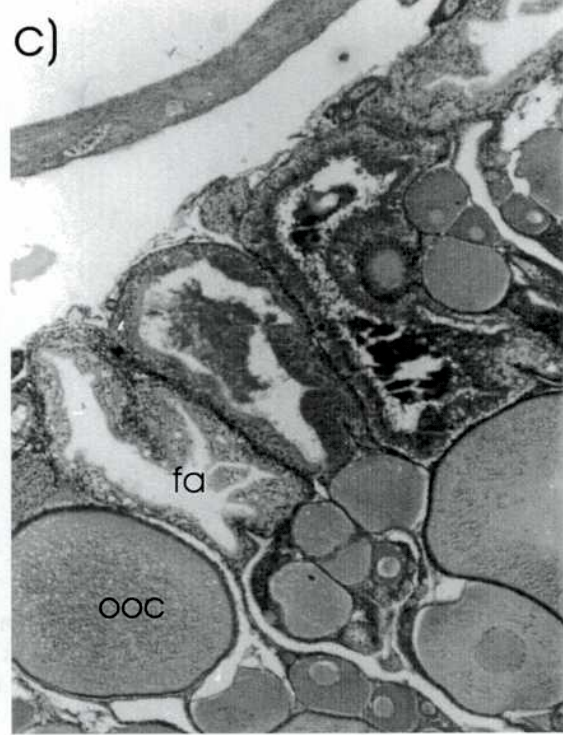
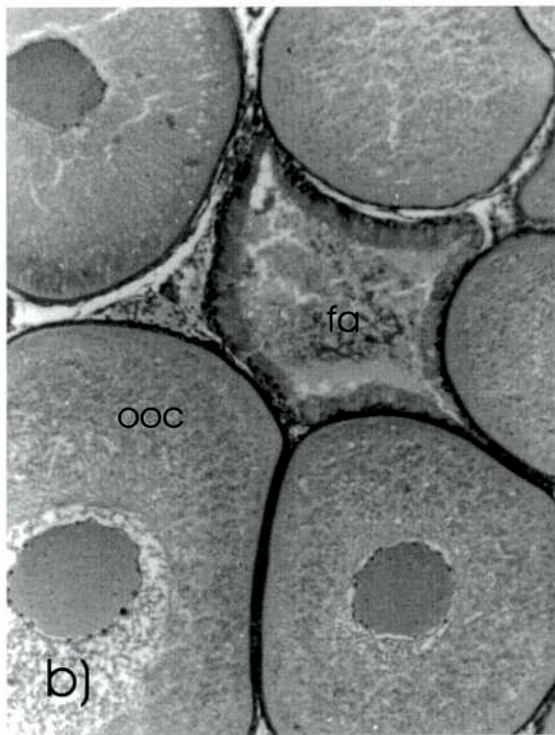
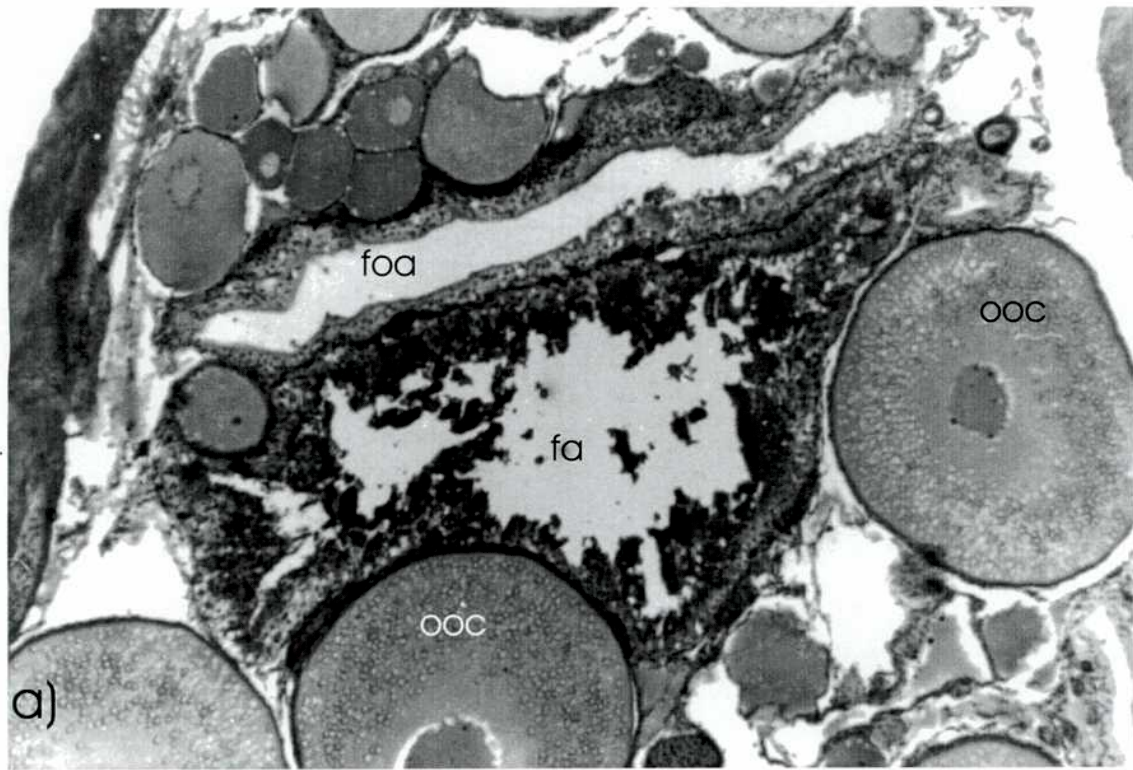
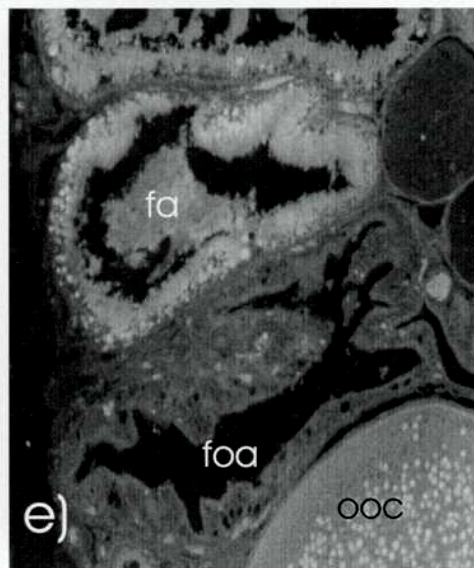
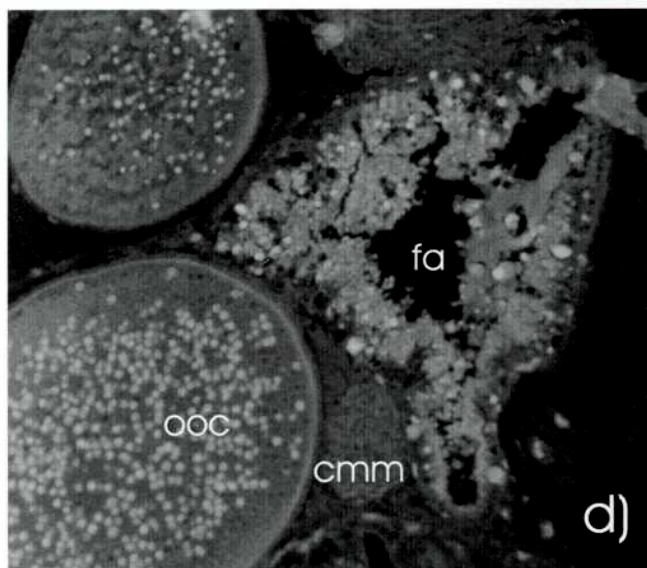
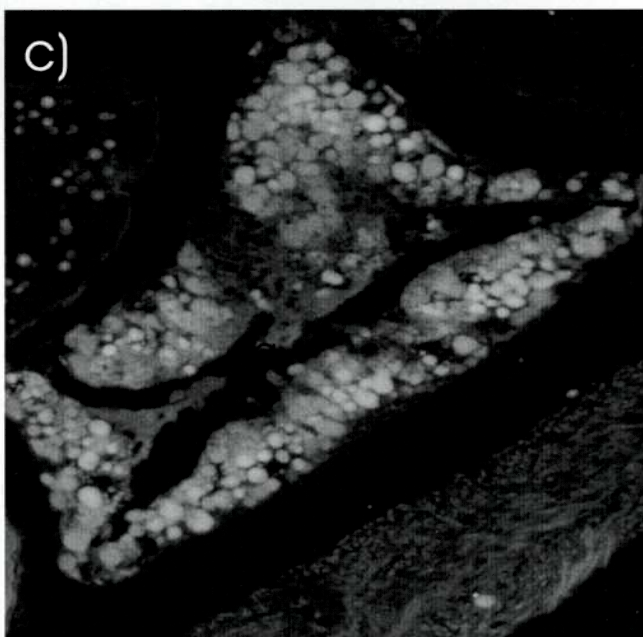
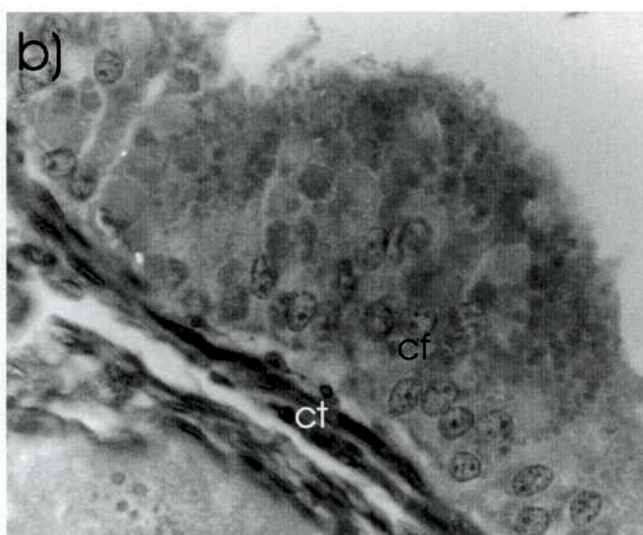
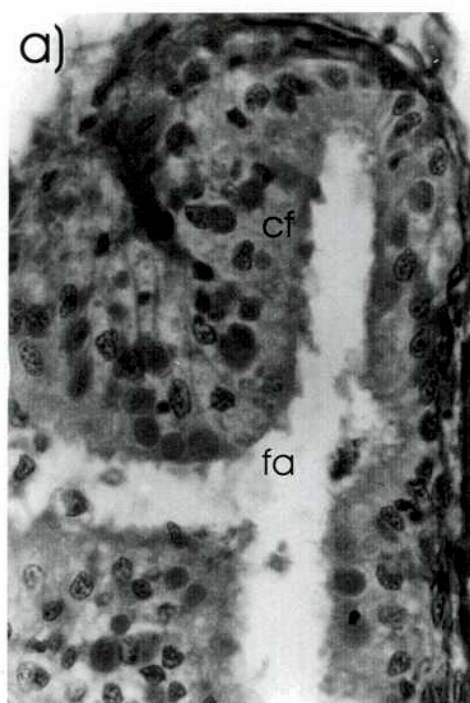


Figura 20: Detalle de la estructura celular en diferentes atresias foliculares. a) y b) detalle de las células foliculares hipertrofiadas, transformadas en células fagocíticas. 600x. c) atresia folicular temprana observada con luz ultravioleta. Se observa la gran intensidad de la fluorescencia y se reconocen las plaquetas vitelinas en reabsorción, 100x. d) atresia folicular media. Las plaquetas vitelinas han disminuido su tamaño y se hacen poco reconocibles, 100x. e) la foto muestra dos figuras atrésicas, una corresponde a un folículo no ovulado en etapas avanzadas de degradación celular, la otra corresponde a un folículo ovulado cuyas células están iniciando procesos de reabsorción. 100x. cf: célula folicular; cmm: centro melano-macrofágico; ct: célula de la teca; fa: folículo atrésico; foa: folículo ovulado en atresia.



En esta etapa, se puede reconocer otro tipo celular que estaría secundariamente involucrado en el proceso de regresión y reabsorción celular. Las células fueron identificadas con test de Giemsa-L, como granulocitos eosinófilos (figura 21a y b). Estos invaden las áreas en degeneración del oocito y se ponen en contacto con las plaquetas vitelinas y restos de citoplasma en donde probablemente liberan su contenido granular con actividad litica, transformando las plaquetas en desechos. Al final del proceso de atresia, los granulocitos eosinófilos, ya desprovistos de su contenido granular, se transforman en células degenerativas que permanecen en el folículo, junto a los restos de oocito, que aparecen como depósitos de pigmentos amarronados. Estos cúmulos de células y desechos citoplasmáticos van concentrándose con el paso del tiempo y dan origen a los llamados “cuerpos marrones”, cuya estructura, composición y función se describen más adelante.

El segundo tipo de estructura en proceso de degradación celular que se puede encontrar en los ovarios, corresponde a los restos de folículos ovulados durante la temporada reproductiva. Dichos elementos están formados por la capa de células foliculares y teca, que se separan del oocito durante la ovulación (figura 22a). El destino último del resto del folículo, parece ser el mismo que los oocitos atrésicos descritos, al menos en la primera etapa de hipertrofia de las células foliculares (figura 22).

En ovarios recién ovulados pueden observarse, sobre la superficie interna de la lamela ovárica las heridas o cicatrices resultantes del proceso de ovulación. Por transparencia pueden identificarse los restos de folículo, como estructuras con aspecto de bolsa o saco colapsado, correspondientes a la teca y la capa folicular (figura 22b y c).

Por último, el tercer tipo de estructura germinal femenina, que inicia procesos de regresión, corresponde a los folículos en distinto estadio de crecimiento que, durante el proceso de reversión sexual natural a macho, dejan de ser funcionales y son degradados según el patrón descrito (figura 22e y f)

Figura 21: a) detalle de una atresia folicular en donde se observa la gran cantidad de eosinófilos periféricos.600x. b) granulocitos eosinófilos dentro de la estructura atrésica. 600x. cff: células foliculares con actividad fagocítica; eo: eosinófilo; tc: tejido conectivo; mb: membrana basal.

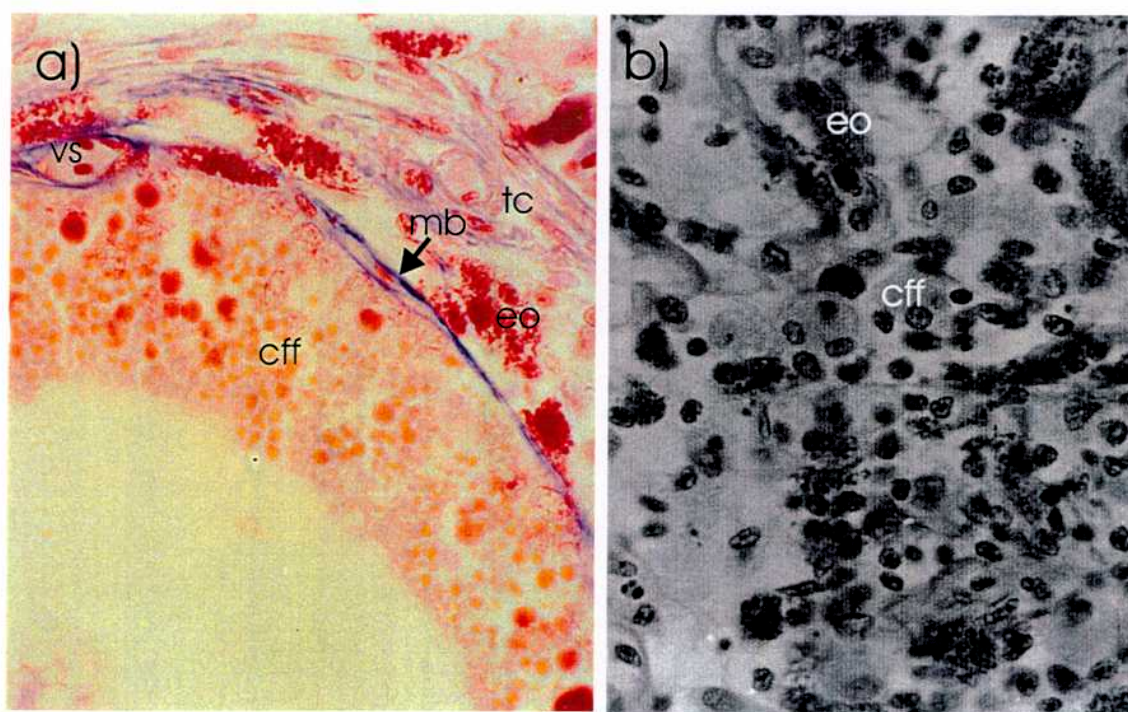
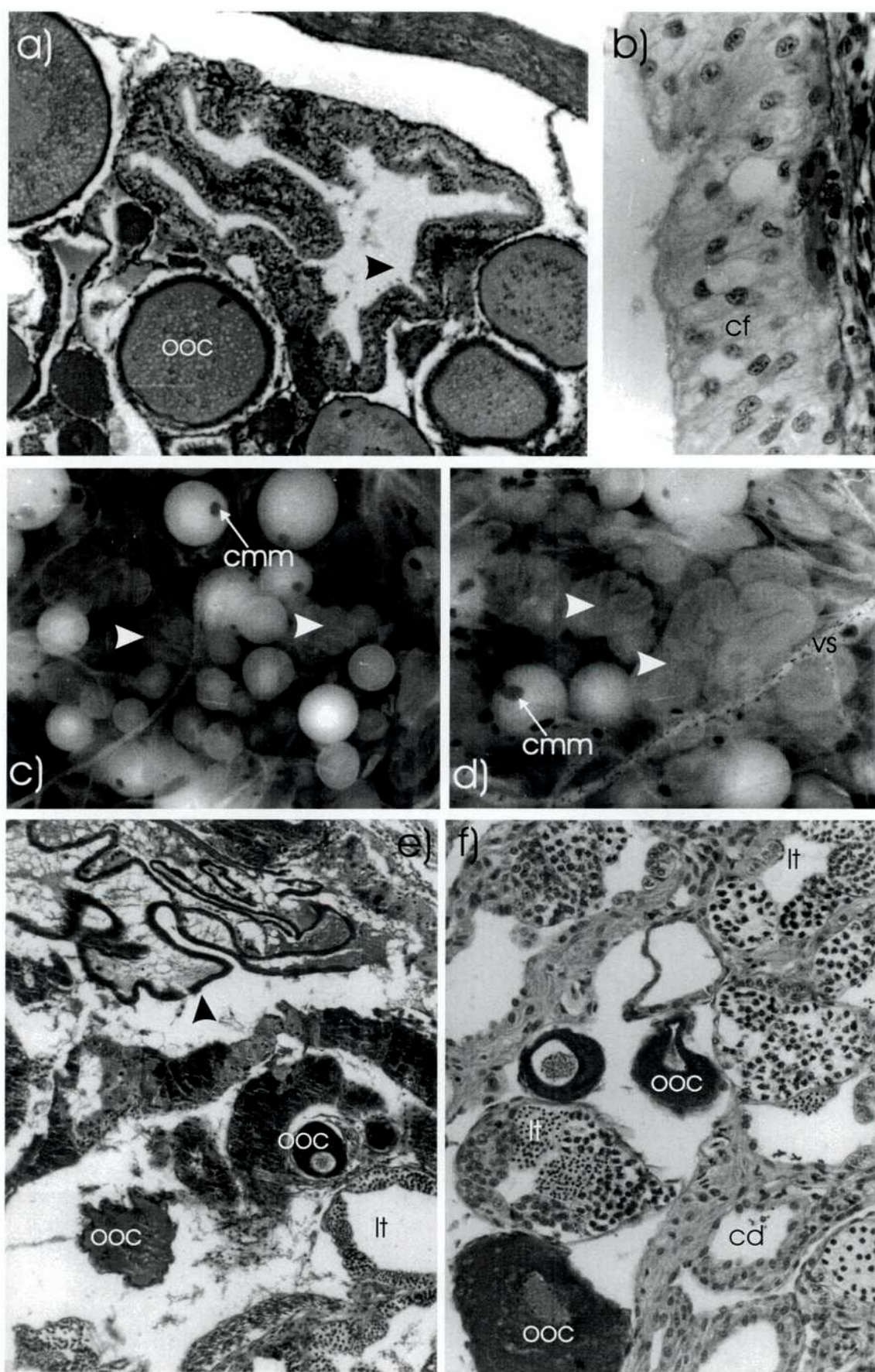


Figura 22: restos de folículos ovulados. a) corte histológico de un folículo ovulado. 100x. b) detalle de las células foliculares hipertrofiadas en folículo ovulado que inicia la regresión. 600x. c) fotografía macroscópica de restos de folículos en un ovario recién ovulado. 20x. d) detalle de folículos ovulados. Se observa la estructura sacular. 30x. e) y f) oocitos residuales al final del proceso de reversión sexual gonadal (100x y 200x). cd: conducto deferente; cf: célula folicular; cmm: centro melano-macrofágico; lt: lóbulo testicular; ooc: oocito; vs: vaso sanguíneo; punta de flecha: folículo ovulado.

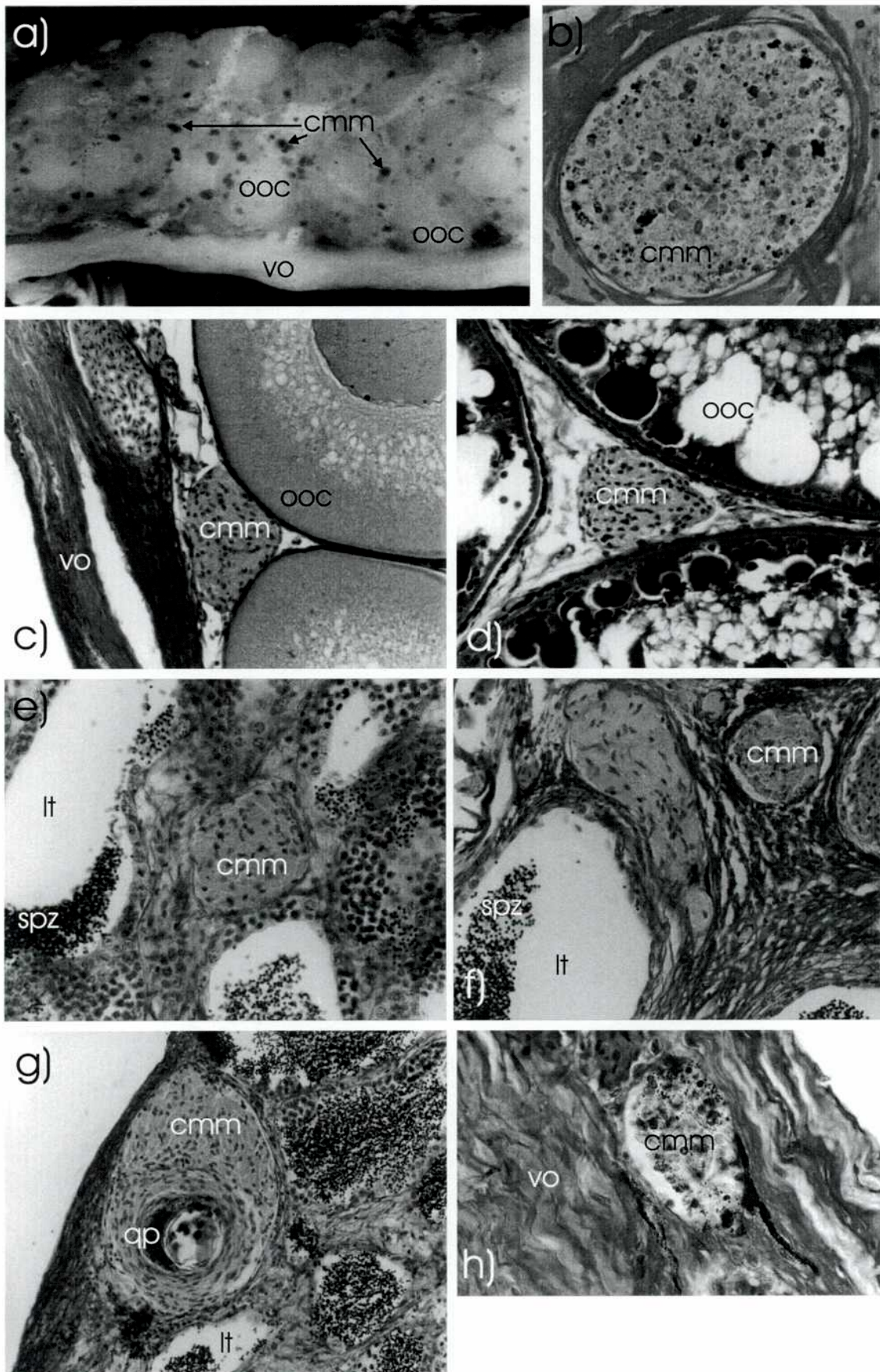


5.2.2. CENTROS MELANO-MACROFÁGICOS

La observación de las gónadas con baja magnificación, permitió reconocer algunas estructuras que aparecen como pequeños cuerpos esféricos con colores que varían entre el marrón y el amarillo. Se encuentran distribuidas en forma homogénea entre las células germinales y el estroma gonadal y sus diámetros varían entre los 25 y 180 μm . Normalmente las más pequeñas corresponden a las más oscuras (figura 23a).

El estudio microscópico muestra grupos o “clusters” de células de tamaño medio, con núcleos ovales pequeños y generalmente picnóticos. El citoplasma se caracteriza por contener inclusiones heterogéneas y granulaciones (figura 23b). Las células se encuentran generalmente rodeadas por una delgada capa de tejido conectivo, que en algunos casos se observa incompleta. Estos grupos celulares no se encuentran necesariamente relacionados con vasos sanguíneos o linfáticos, sino que su distribución parece ser al azar. Se encontraron igualmente distribuidos en ovarios en diversos estadios de desarrollo y crecimiento oocitario (figura 23c y d), en testículos de machos originados por reversión sexual a partir de hembras adultas (machos secundarios) (figura 23e), en estadios intermedios de transformación gonadal (intersexos), en testículos de machos determinados desde las primeras etapas del desarrollo (machos primarios) (figura 23f). Ocasionalmente se han observado asociados con quistes de parásitos gonadales (figura 23g), en la vaina ovárica (figura 23h) y en otros órganos (Ravaglia, datos no publicados).

Figura 23: Centros melano-macrofágicos (cmm). a) aspecto general de un ovario en donde se observan cmms. Se puede apreciar su estructura globular y la distribución homogénea en la superficie interna de la lamela ovárica (10x). b) corte histológico semifino de un cmm mostrando la heterogeneidad de sus inclusiones y granulaciones (400x). c) y d) fotomicrografía en donde se puede observar la ubicación de los cmm en ovarios en distinto grado de desarrollo (200x). e) corte histológico de testículo de un macho revertante en donde se aprecia un cmm (200x). f) cmm presente en testículo de macho primario (no revertante)(200x). g) cmm asociado a un quiste parasitario: h) cmm inmerso en la vaina ovárica. lt: lóbulo testicular; ooc: oocito; qp: quiste parasitario; spz: espermatozoides; vo: vaina ovárica.



BAZO E HIGADO

La estructura y morfología de los CMM encontrados en el bazo y en el hígado coincide con la descripción histológica característica de estas células. Son grupos celulares con contenidos heterogéneos en sus citoplasmas que se encuentran distribuidos a lo largo de todo el tejido linfo-hematopoyético y están generalmente asociados con vasos sanguíneos (figura 24a y b). La bibliografía consultada señala la presencia en el bazo, el hígado y el riñón de los teleosteos, de estructuras similares a las encontradas en las gónadas. Estas han sido descritas como CMM, componentes normales del sistema inmune de los teleosteos.

Se realizaron diferentes técnicas histoquímicas usando cortes histológicos de bazo e hígado como control positivo de la técnica. Los resultados fueron los siguientes:

PAS *	+	+	+
SCHMORL *	++	++	++
LONG ZIHEL-NEELSEN **	+	+	+
SUDAN BLACK B **	+	+	+
FLUORESCENCIA *	+++	+++	+++

<i>TÉCNICAS PARA MELANINA</i>			
FERROUS IRON TECHNIQUE *	+	++	++
MASSON-FONTANA *	+	++	++

* Pearse, 1985

** Bancroft & Stevens, 1990.

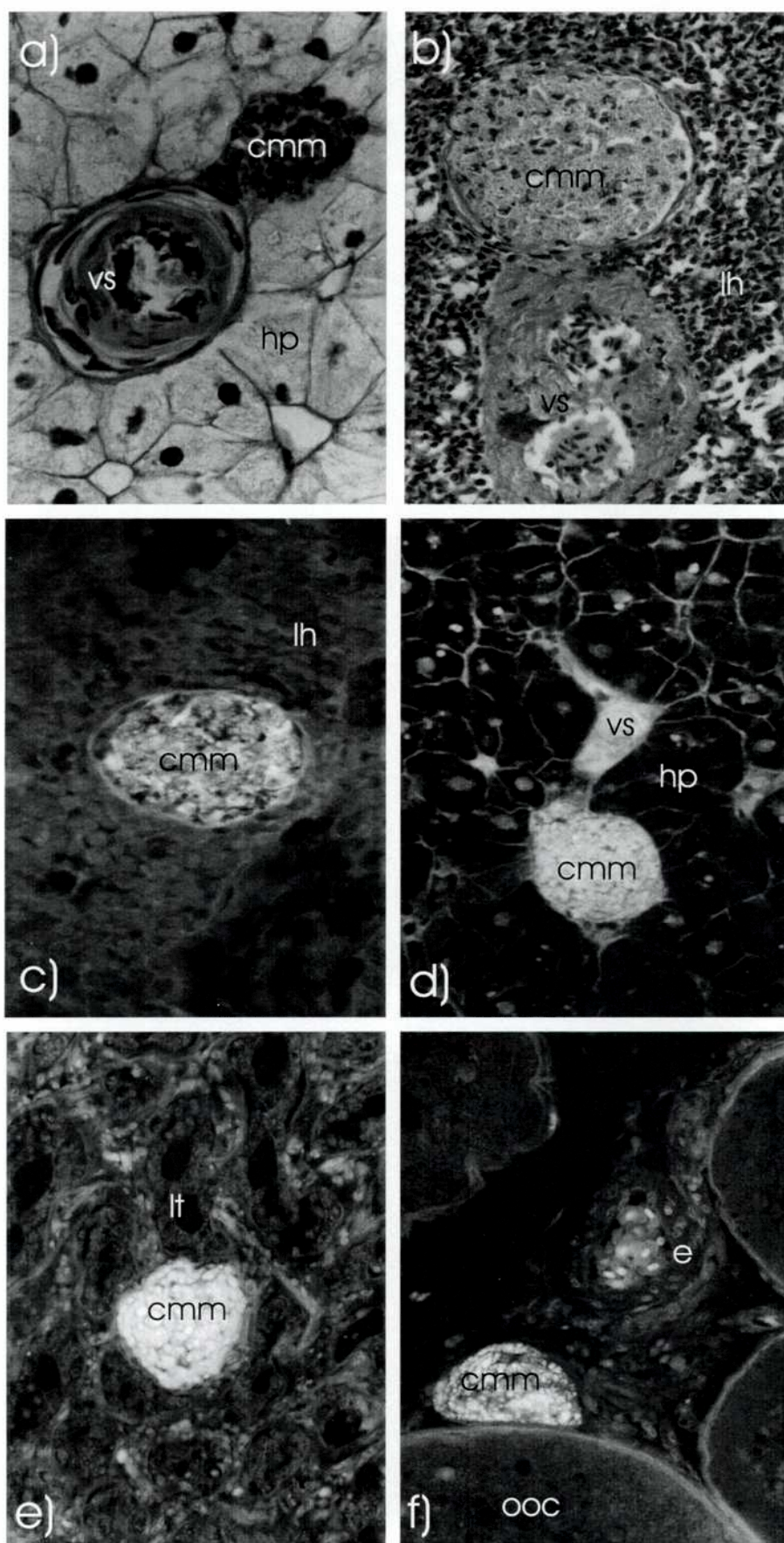
El análisis histoquímico mostró la presencia de sustancias con características similares a las lipofuscinas, especialmente en las estructuras observadas en las gónadas. La presencia de melanina demostró ser mayor en bazo e hígado que en gónadas, donde se observa con una distribución heterogénea.

Las estructuras de los diferentes órganos mostraron una fuerte reacción autofluorescente al ser iluminadas con luz ultravioleta y filtros BV y BV2 (400-440 nm), aunque con diferencias de intensidad en los diferentes órganos (figura 24c-f).

TINTA CHINA COMO INDICADOR DE ACTIVIDAD FAGOCITICA.

Los CMM del bazo y del hígado, y las estructuras en estudio en las gónadas, mostraron la presencia de partículas de carbón en el interior del citoplasma, aunque su concentración fue menor en gónadas que en el resto de los órganos tratados. Aunque los macrófagos libres del retículo endotelial de las gónadas mostraron haber incorporado una mayor cantidad de tinta china que aquellos de los cúmulos celulares. 48 horas después de la inyección, las partículas de carbón en todas las estructuras estudiadas habían aumentado su densidad en los CMM.

Figura 24: a) cmm presente en tejido hepático (600x). b) cmm en tejido del bazo, asociado a vasos sanguíneos (200x). c), d) e) y f) cmm en bazo, hígado ovario y testículo respectivamente, mostrando la fuerte autofluorescencia presente al ser excitados con luz UV (200x). e: eritrocitos; hp: hepatocito; lh: tejido linfo-hematopoyético; lt: lóbulo testicular; ooc: oocito; vs: vaso sanguíneo; flecha: cmm.



5.2.3. ULTRAESTRUCTURA DE LA ZONA CORTICAL DEL FOLÍCULO OVÁRICO

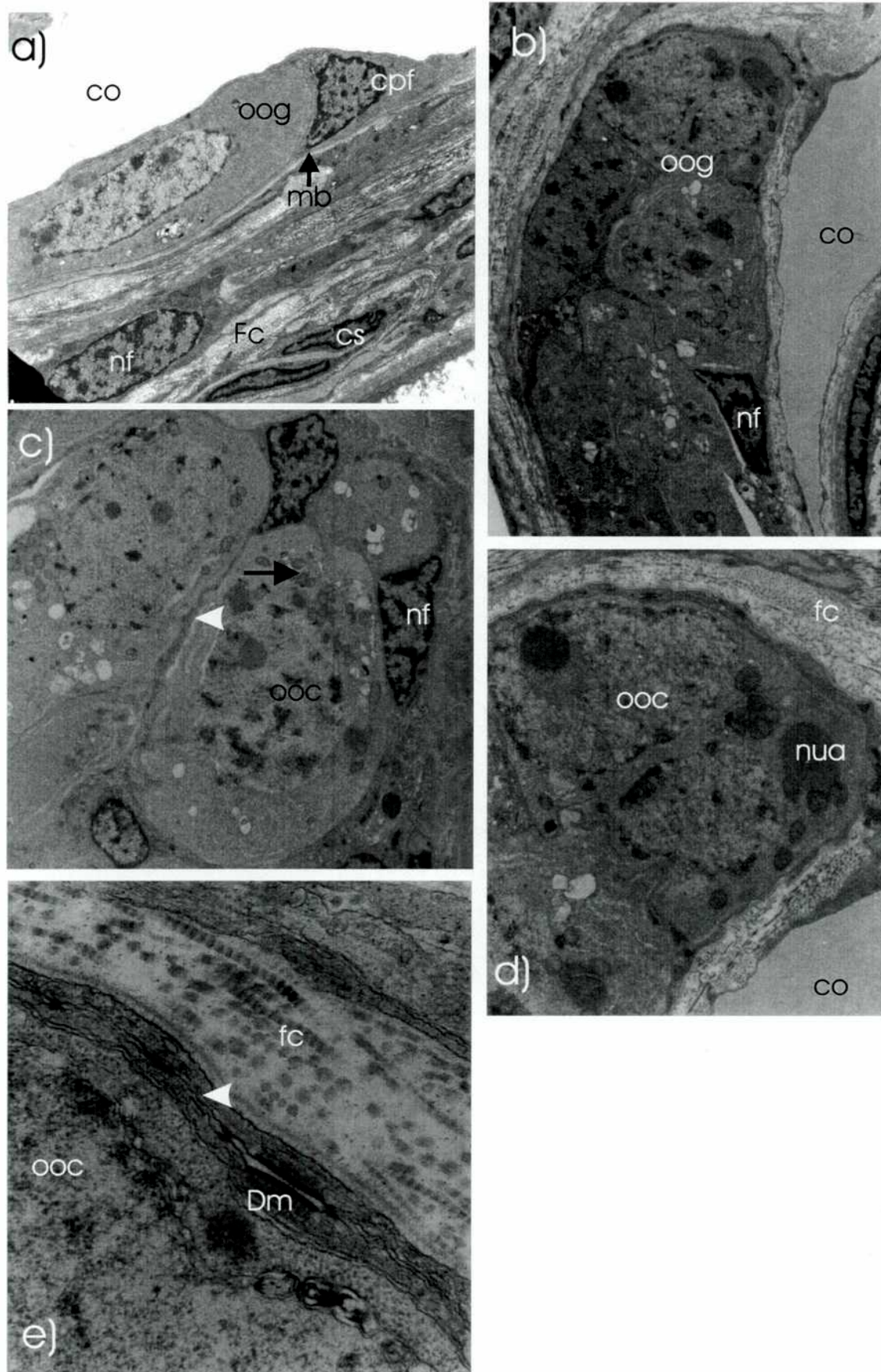
- OOGONIAS

El estudio ultraestructural de las oogonias muestra un núcleo voluminoso, con cromatina en general difusa o levemente grumosa, y en general un nucleolo (a veces pueden observarse dos) de aspecto homogéneo. Dentro del citoplasma se encuentran numerosas mitocondrias que tienden a ubicarse cerca de uno de los polos de la célula, alrededor del núcleo. Son normalmente de forma redondeada o levemente elongada (figura 25c).

En el citoplasma se observa abundante retículo de Golgi y vesículas rodeadas de membrana que serían presumiblemente lisosomas y peroxisoma. Ocasionalmente se observó la presencia de material electrodens o “nuage”, ubicado cerca del grupo de mitocondrias (figura 25d). Las oogonias que forman nidos, se encuentran unidas entre sí por aposición de membranas (figura 25b). Esta unión es solo temporal, pues al poco tiempo, el citoplasma de las células foliculares envuelve a cada oogonia, aislándolas totalmente (figura 25c y e).

El citoplasma de las células foliculares en este estadio, es abundante en extensión aunque no en volumen, debido a la forma en que se dispone para envolver al oocito. El núcleo de las células foliculares presenta forma generalmente poliédrica o elíptica, con la cromatina formando grumos muy electrodensos, y dispuestos tanto en forma central como periférica (figura 25a y b). Las uniones celulares más comunes observadas entre las células foliculares son los desmosomas, que son abundantes y en algunos casos de gran tamaño (figura 25e). Las organelas citoplasmáticas más conspicuas que se pueden observar en este estadio, son el retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias y algunas vesículas que corresponden probablemente a lisosomas. Dado el tipo de citoplasma muy delgado, es difícil poder observar otro tipo de estructuras.

Figura 25: Ultraestructura de estadios primarios de desarrollo del folículo ovárico. a) aspecto general del epitelio germinal con una oogonia y una célula prefolicular (x1500). b) detalle de un nido de OOG. Pueden observarse dos OOG que aún no han sido separadas por citoplasma de células foliculares (x1500). c) y d) detalle de un nido de OOG transformándose en OOC. Se observa como el citoplasma de las células prefoliculares envuelve con proyecciones muy delgadas a los oocitos separándolos totalmente uno de otro (x1700). e) detalle de un desmosoma de unión inter-folicular (x3000). co: cavidad ovárica. cs: célula somática; dm: desmosoma; fc: fibras colágenas. mb: membrana basal; nf: núcleo de célula folicular; nua: nuage; oog: oogonia; ooc: oocito. flecha: grupo de mitocondrias; punta de flecha: citoplasma de célula folicular.



ESTADIO PERINUCLEOLAR

En este estadio, la capa monoestratificada de células foliculares es muy evidente y el número de células que conforman el folículo es muy numeroso. Las células son planocúbicas, con núcleo oval y cromatina grumosa desplazada mayoritariamente hacia la periferia. Por fuera de la capa de células foliculares y separada por una gruesa membrana basal, se encuentran las células tecales, de aspecto plano. Entre la membrana basal y las células tecales, se puede observar una capa particularmente gruesa de fibras colágenas extracelulares (figura 26a). En el citoplasma de las células foliculares se observan numerosas mitocondrias con crestas tubulares, gran número de ribosomas libres, retículo endoplasmático liso y rugoso, y un aparato de Golgi bien desarrollado, lo que indica una activa síntesis. Las mitocondrias con crestas tubulares, el retículo endoplasmático liso y los numerosos ribosomas libres son estructuras características de células esteroideogénicas.

El contacto entre la membrana plasmática del oocito y la de las células foliculares, deja de ser estrecho, como se observa en los primeros estadios de desarrollo. El espacio entre ambos es muy notorio. En la superficie del oocito comienzan a formarse microvellosidades que se entrelazan en forma muy irregular con las emitidas posteriormente por las células foliculares y que presentan diámetros que varían entre 0.06-0.1 μm , (figura 26b).

El citoplasma del oocito presenta numerosas mitocondrias tubulares (figura 26b y c y 27a) y retículo endoplasmático liso, así como gran cantidad de ribosomas libres (figura 26c). Ocasionalmente aparecen inclusiones de alta electrodensidad que corresponderían a residuos celulares, conocidos como cuerpos mielínicos (figura 27b).

A medida que continua el desarrollo, las microvellosidades se van haciendo más largas y se van ordenando en forma paralela (figura 27b y c). Junto a la membrana plasmática del oocito y entre las digitaciones se comienza a depositar material acelular de aspecto amorfo (figura 27c). La endocitosis de material extracelular se hace mayor (figura 27d) En el citoplasma del oocito aparecen grandes vacuolas sin bordes de

membrana. En el espacio entre las células foliculares y el oocito se pueden observar gran número de estructuras de aspecto vesicular, rodeadas de membrana, con el mismo aspecto de las observadas en el espacio intercelular entre células foliculares que corresponderían a cuerpos multivesiculares (figura 28c). La membrana basal se hace más gruesa y toma una estructura de aspecto multilaminar (15 a 20 capas) en donde las capas más alejadas de la zona folicular toman un aspecto más compacto (figura 27e).

En etapas de crecimiento más avanzadas se observa una capa continua de material acelular depositado entre las microvellosidades del oocito y aquellas de las células foliculares. En esta etapa se pueden reconocer dos capas con diferentes electrodensidades (figura 28a). Este depósito corresponde a las primeras etapas de formación de la membrana vitelina. Su diámetro en este estadio es de aproximadamente 1-1,3 μm . La subunidad externa en contacto con la capa de células foliculares es de mayor electrodensidad y su diámetro varía entre 0,4 y 0,6 μm . La subunidad interna tiene un ancho de 0,3 a 0,5 μm de diámetro.

En la región basal de las digitaciones del oocito se pueden observar invaginaciones de la membrana plasmática que corresponden a la incorporación de material extracelular por endocitosis. Las vesículas formadas están rodeadas de clatrina (figura 30b). Por fuera de la membrana vitelina, las vellosidades de las células foliculares se alargan considerablemente, entremezclándose sin orden aparente (figura 28b).

Figura 26: Ultraestructura de la zona cortical de un folículo en estadio perinucleolar. a) Detalle de la zona de contacto entre el oocito y la célula folicular. La membrana plasmática del oocito emite microvellosidades que se entrelazan con las emitidas por las células foliculares. Se observan numerosas mitocondrias tubulares en el citoplasma del oocito. Una gruesa membrana basal separa a las células foliculares de las tecales. (x2000). b) Zona cortical de un folículo en desarrollo. Se observa las múltiples capas que conforma la membrana basal. El número de microvellosidades foliculares y oocitarias aumenta, así como el grado de contacto entre las mismas (x3000). c) Detalle de zona de contacto entre la célula folicular y el oocito. En el citoplasma de las células foliculares se observa retículo endoplasmático liso (REL), mitocondrias con crestas tubulares y gran cantidad de ribosomas libres. Sobre la superficie de la membrana plasmática del oocito se desarrolla gran cantidad de vesículas endocíticas. En el citoplasma del oocito también se observan numerosas mitocondrias tubulares y REL (x20000). cm: cuerpos mielínicos; fc: fibras colágenas; m: mitocondrias; mb: membrana basal; mic: microvellosidades; nf: núcleo de célula folicular; nt: núcleo de célula tecal; ooc: oocito; rel: retículo endoplasmático liso; punta de flecha: ribosomas; flecha: vesículas endocíticas.

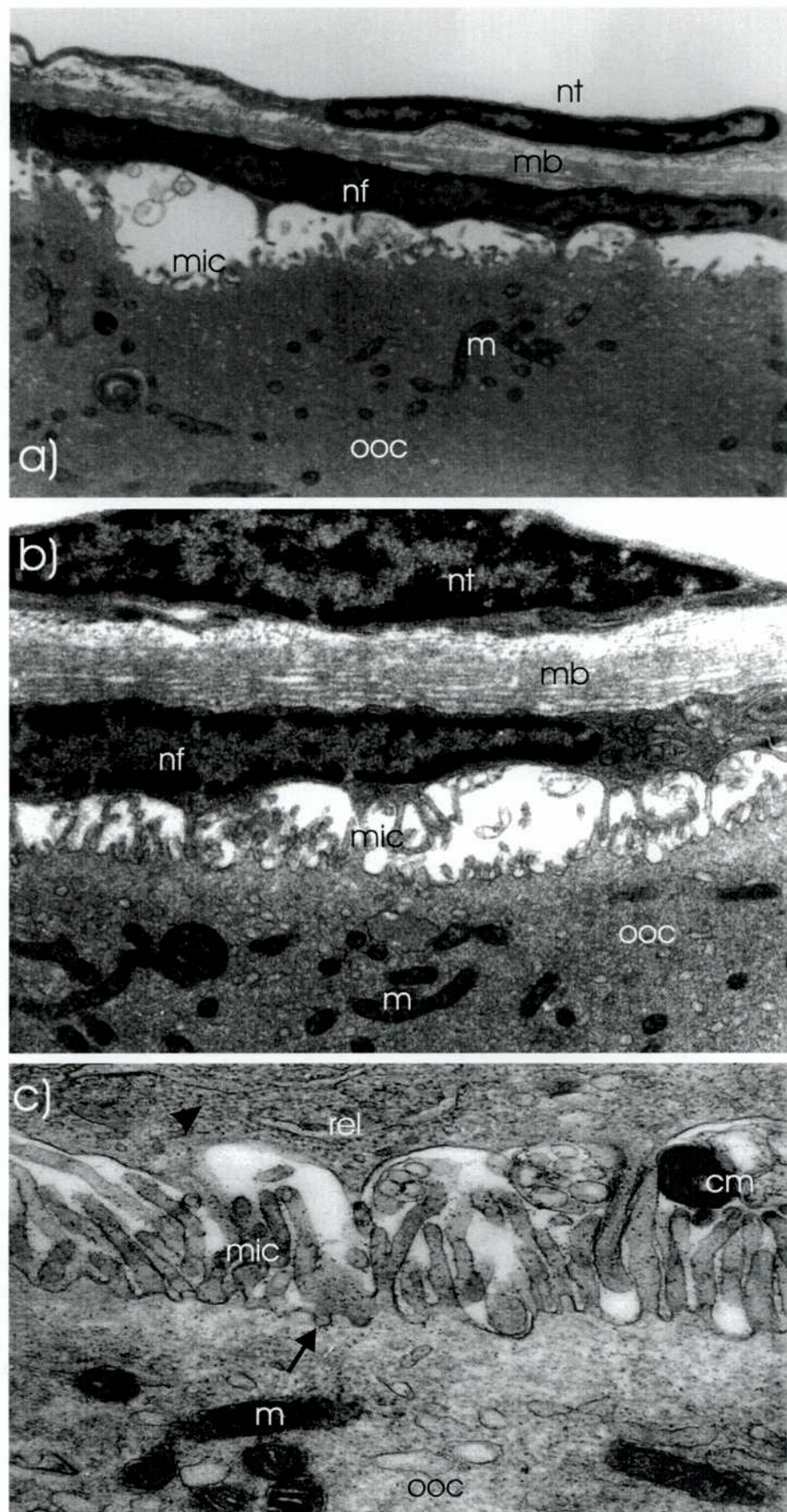


figura 27: Ultraestructura de la zona cortical de un folículo en estadio perinucleolar medio. a) El número de microvellosidades del oocito y de las células foliculares aumenta progresivamente.(x4000). b) Las microvellosidades se ordenan paralelamente entre si. Se observa gran cantidad cuerpos multivesciculares en el espacio subfolicular y entre las células foliculares (x3600). c) Zona de interdigitación de microvellosidades mostrando los primeros depósitos de material acelular de la envoltura vitelina, y gran número de vesículas endocíticas en formación sobre la membrana plasmática oocitaria. (x30000). d) Detalle de vesículas de endocitosis en formación (x85000).e) Detalle de la membrana basal en donde se aprecia su estructura multilaminar (x72000). cmv: cuerpos multivesciculares; m: mitocondrias tubulares; mb: membrana basal; mic: microvellosidades; nf: núcleo de célula folicular; ooc: oocito; rel: retículo endoplasmático liso; punta de flecha: ribosomas; flecha: vesículas endocíticas.

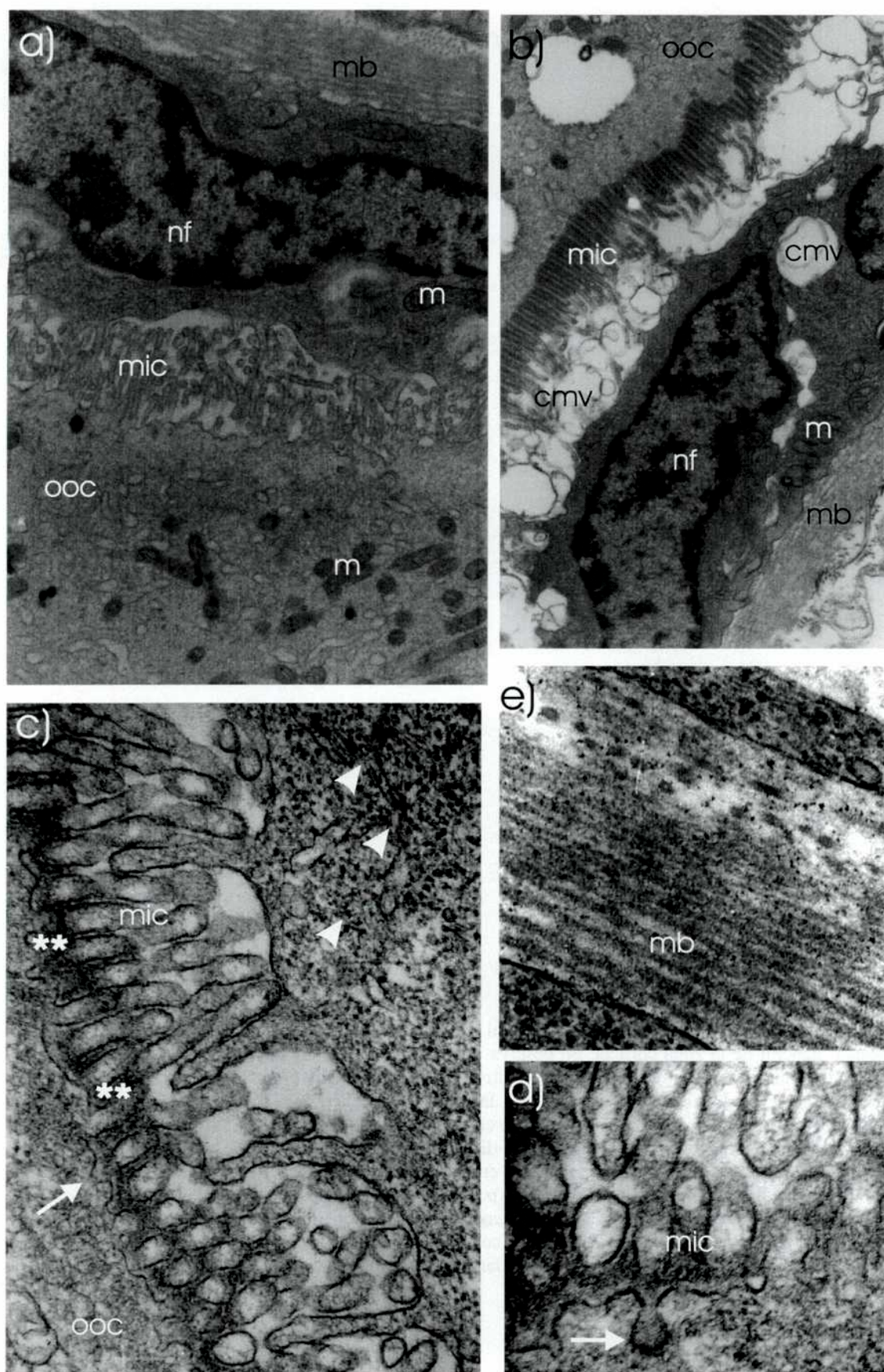
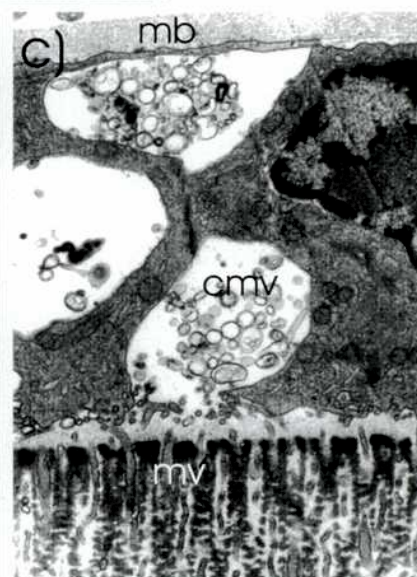
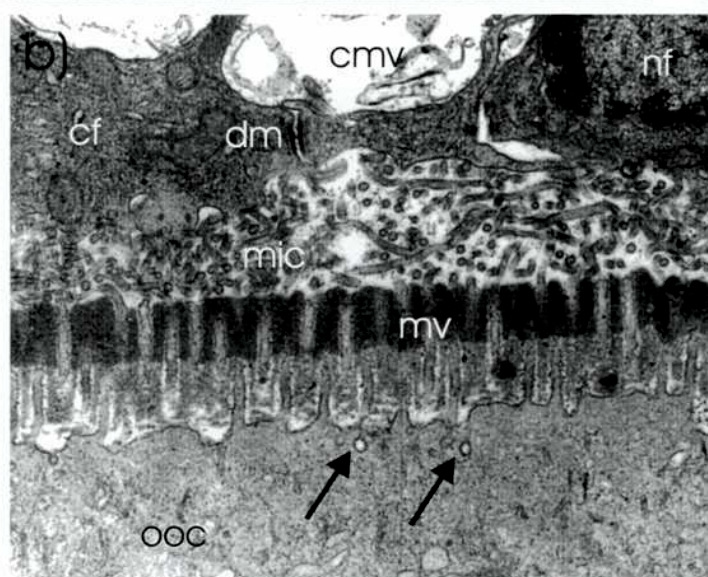
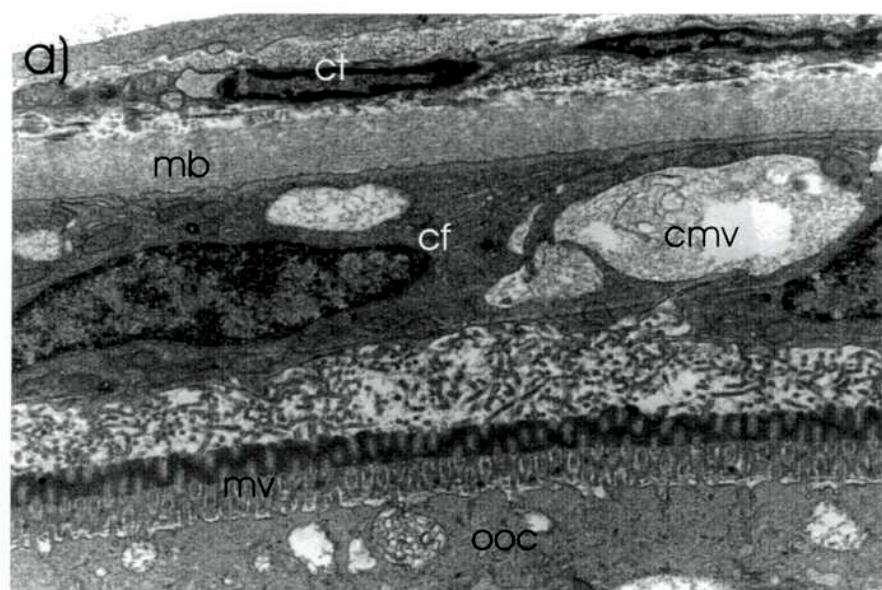


Figura 28: Ultraestructura de la zona cortical de un folículo en estadio perinucleolar avanzado. a) Aspecto general de la zona cortical. Se observa la capa tecal plana, la membrana basal gruesa, la capa folicular plano-cúbica con grandes cuerpos multivesciculares, el espacio subfolicular con gran número de microvellosidades dispuestas irregularmente, la envoltura vitelina atravesada por microvellosidades ordenadas radialmente y paralelas entre si y el citoplasma del oocito (x3000). b) Detalle de la envoltura vitelina en donde se aprecian las dos capas de distinta electrodensidad que la componen en este estadio. La más electrodensa (oscura) es externa. La endocitosis continúa sobre toda la superficie del oocito (x5300) c) detalle de la disposición de los cuerpos multi-vesciculares (cmv) entre las células foliculares. Se observa como vuelcan su contenido heterogéneo en el espacio perivitelino (x5300). cf: citoplasma cél. folicular; cmv: cuerpos multi-vesciculares; ct: célula tecal; dm: desmosoma; mb: envoltura vitelina; mv: envoltura vitelina; nf: núcleo de la célula folicular; ooc: oocito; flecha: vesícula endocítica.



OOCITO VITELOGÉNICO

En esta etapa el tamaño del oocito se ha incrementado significativamente como resultado de la activa incorporación de vitelogenina proveniente principalmente del hígado vía torrente sanguíneo. Se observa la presencia de algunas plaquetas vitelinas. Las organelas celulares se encuentran desplazadas a la región periférica del citoplasma, debido a la presión que ejerce el vitelo. Puede observarse la activa incorporación de material extracelular por medio de figuras endocíticas en la membrana plasmática del oocito.

Las digitaciones del oocito y de las células foliculares se han incrementado en longitud y en diámetro. La membrana vitelina se ha engrosado considerablemente y su estructura se acompleja por la acumulación de gran número capas (entre 30 y 40 aproximadamente). Posteriormente las capas se hacen más compactas y toman una disposición alternada y levemente ondulada (figura 29a). Las vellosidades foliculares y del oocito la atraviesan en toda su extensión, con un recorrido ondulante y de aspecto espiralado. Debido al significativo crecimiento del oocito, las vellosidades se han espaciado entre sí (figura 29b y c).

En el citoplasma de las células foliculares, se destacan mitocondrias con crestas tubulares, gran cantidad de retículo liso y ribosomas libres y grandes vesículas con material amorfo y homogéneo que corresponderían a vitelogenina extracelular que será incorporada al oocito (figura 29c).

En estadios más avanzados de crecimiento, la superficie externa de la membrana vitelina, se cubre con una capa continua y delgada de material muy electrodensito, que se interrumpe únicamente en la zona de paso de las digitaciones. Su espesor, constante, es de aproximadamente 0.2 μm (figura 29a y b). Dentro del poro canal, las vellosidades no parecen ponerse en contacto, aunque por fuera del mismo, el extremo de una digitación se pone en estrecho contacto con la membrana celular de la otra célula (figura 30c).

Figura 29: Estadio 3. Oocito vitelogénico. a) Aspecto general de zona cortical de oocito vitelogénico. Se observa la envoltura vitelina estratificada, y las digitaciones oocitarias y foliculares atravesándola radialmente. en el citoplasma del oocito se observan plaquetas vitelinas, y gotas de lípidos (x3000). b) Detalle de la envoltura vitelina y las microvellosidades foliculares. En el citoplasma folicular se observa cisterna de Golgi muy desarrolladas y gran cantidad de mitocondrias (x4700). c) en el citoplasma de la célula folicular también se observan vesículas de vitelogenina, que serán incorporadas al oocito (x5200). cf: célula folicular; ct: célula tecal; gl: gota de lípido; mic: microvellosidad; mv: envoltura vitelina; ooc: oocito; pv: plaqueta vitelina; vs: vaso sanguíneo; flecha: vesícula de vitelogenina.

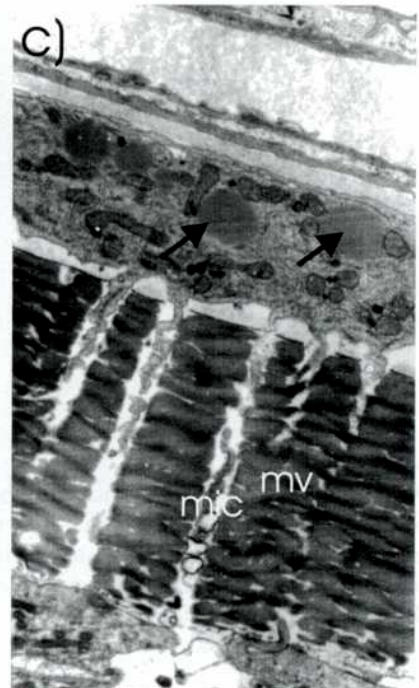
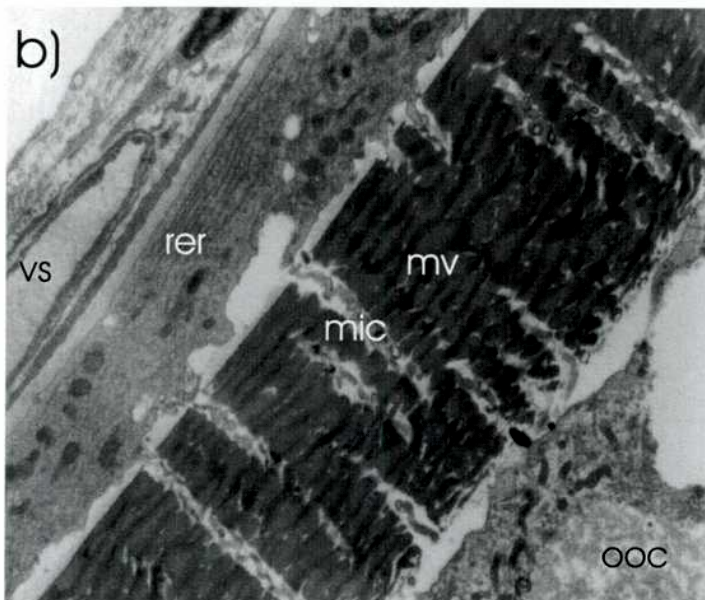
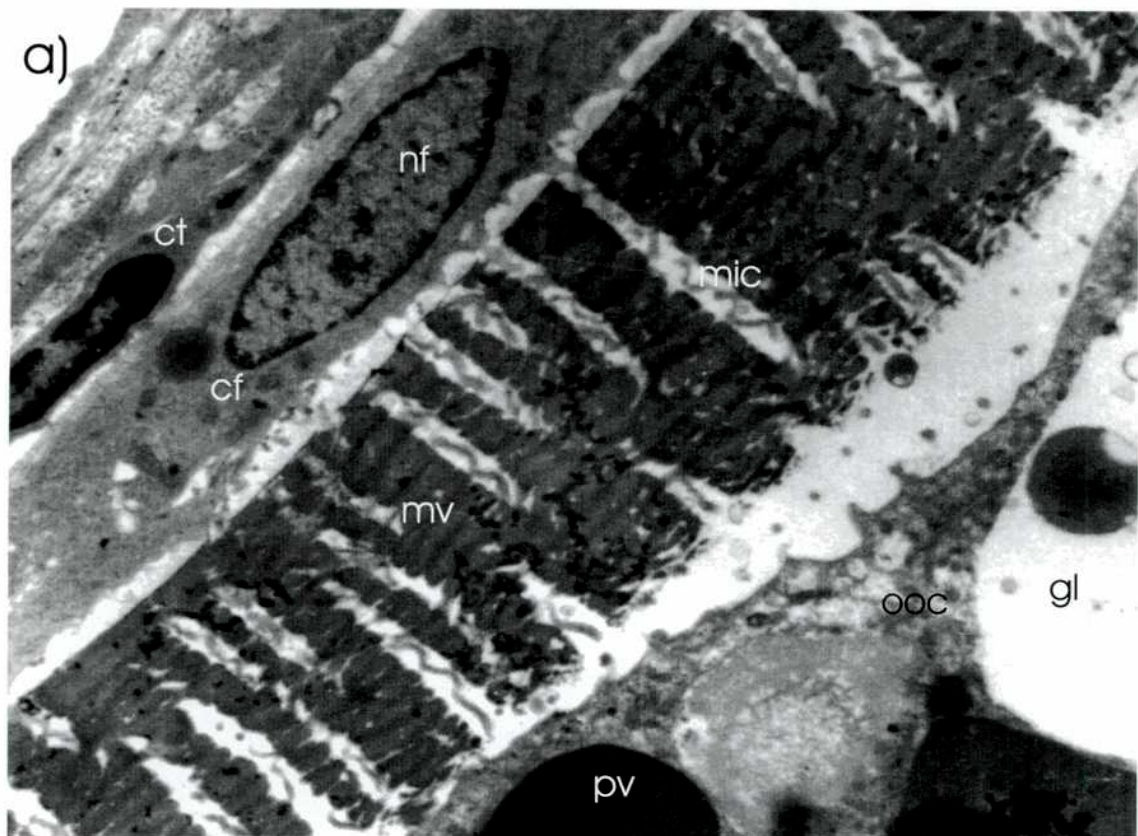
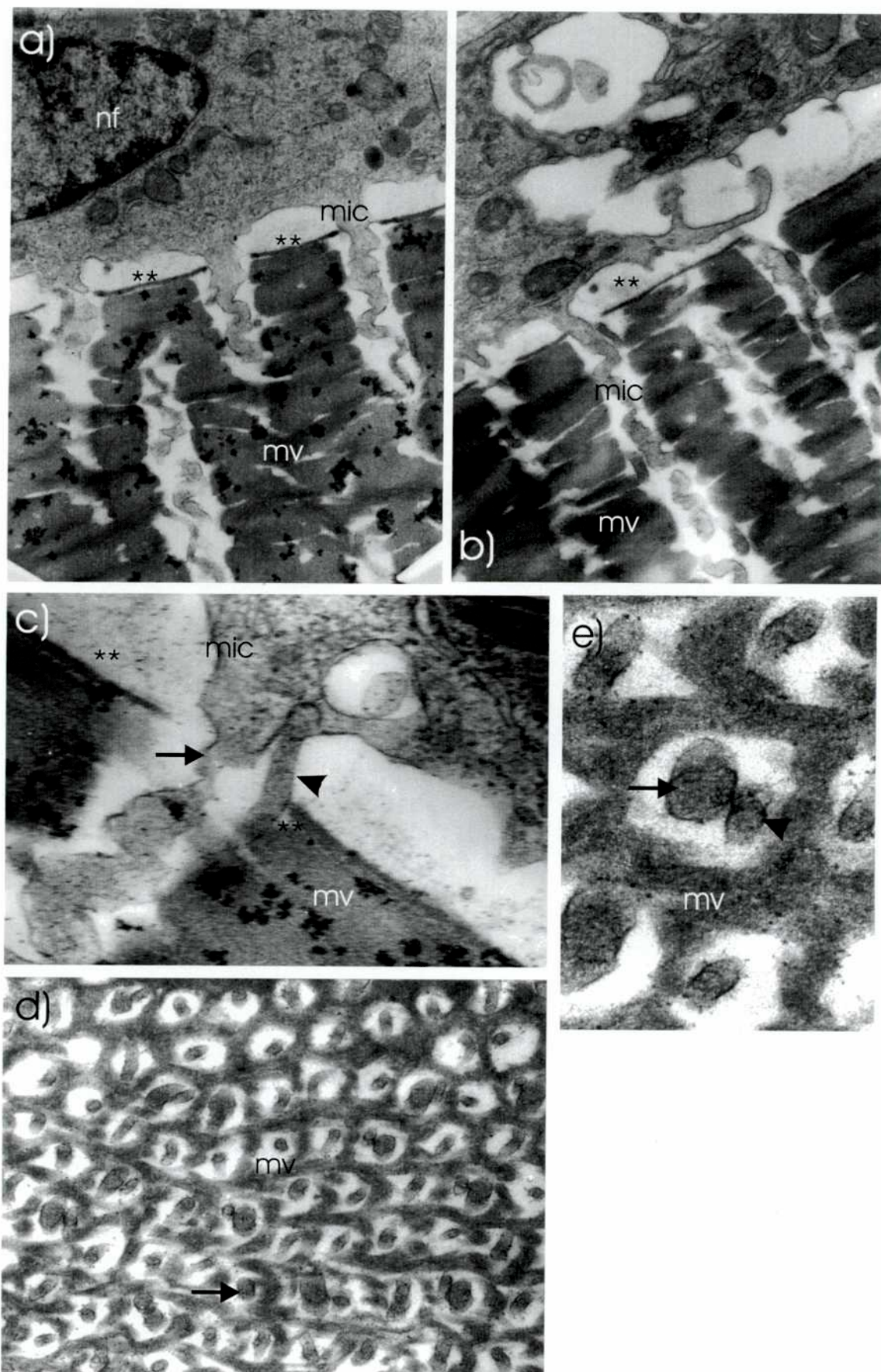


Figura 30: Oocito vitelogénico avanzado. a) y b) Detalle de la superficie de la envoltura vitelina. Se observa el punto de penetración de las vellosidades foliculares, típicamente espiraladas, Puede apreciarse sobre la superficie de la envoltura vitelina, una delgada capa de mayor electrodensidad, que se interrumpe únicamente en el punto de entrada de las digitaciones (x9000). c) detalle de el punto de contacto entre una digitación folicular y la porción terminal de una digitación oocitaria (x20000). d) corte tangencial de la envoltura vitelina, mostrando la gran cantidad de microvellosidades que la atraviesan. Se observan poros con una digitación (folicular) y otras con dos (folicular y oocitaria) (x9000). e) detalle de un poro canal con una microvellosidad de la célula folicular (gruesa) y otra del oocito (fina) (x23000). mic: microvellosidad; mv: envoltura vitelina; flecha: microvellosidad folicular, punta de flecha: microvellosidad oocitaria.

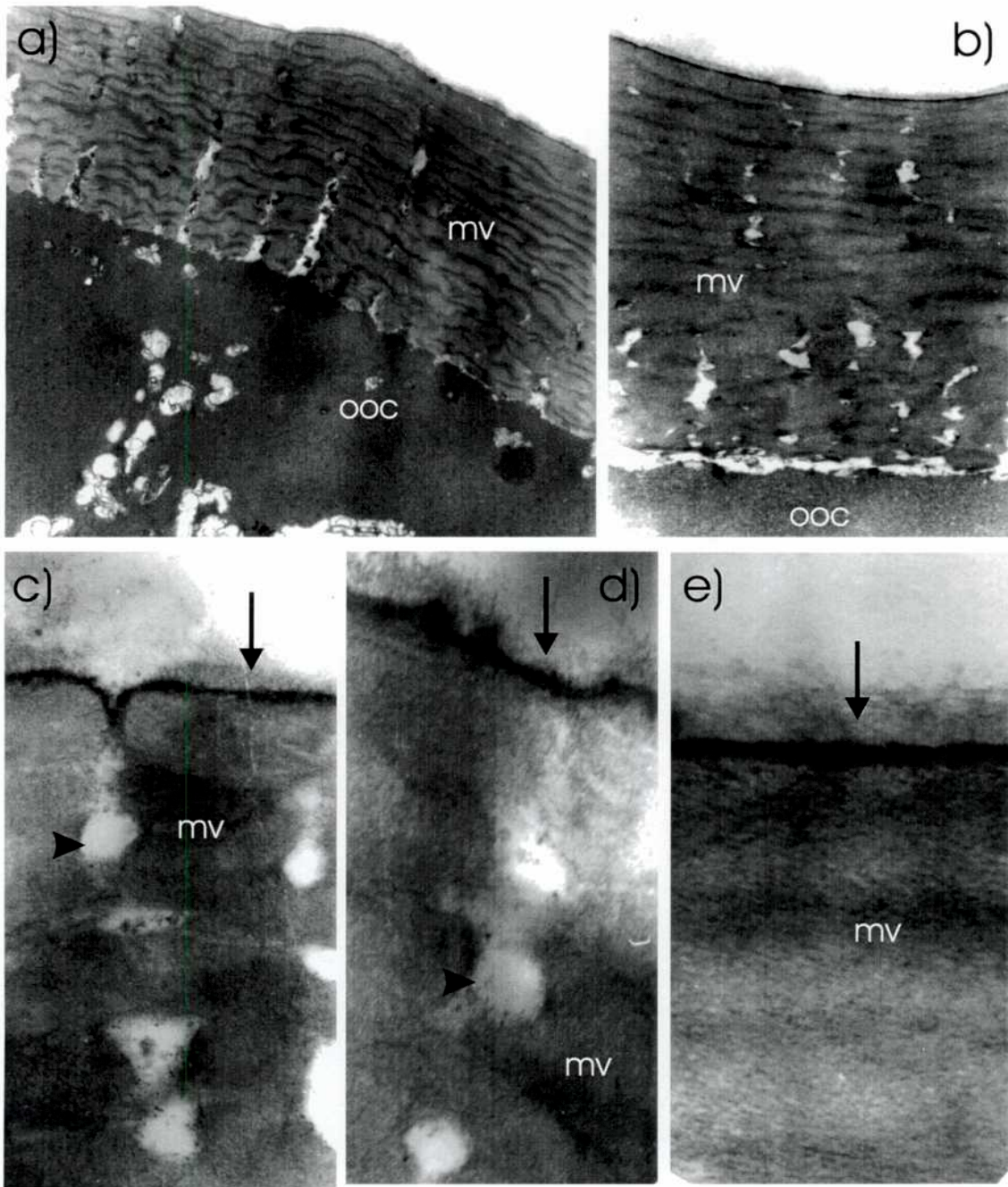


La membrana vitelina, ya totalmente formada, tiene el típico aspecto radiado de su homóloga en mamíferos, la “zona radiata”. En corte sagital, puede observarse la disposición de los numerosos poros canales y de las vellosidades en su interior que en su mayoría se ubican de a una, aunque ocasionalmente, pueden observarse de a pares (figura 30d y e).

- OOCITO OVULADO

En este estadio el oocito ha sido ovulado, quedando la capa de células foliculares y tecaes en el ovario, como resto de folículo ovulado. La membrana vitelina, se observa con la misma estructura del estadio anterior. Tanto las microvellosidades de las células foliculares, como las del oocito, se han retraído en forma previa a la ovulación, dejando los poros canales, vacíos, los cuales se ocluyen parcialmente (figura 31a y b). En la membrana vitelina la capa más externa, de alta electrodensidad, se va completando, obturando los poros canales (figura 31c, d y e). La superficie externa de la misma es lisa y no se observa ningún tipo de ornamentación o membrana adhesiva alguna.

Figura 31 Estadio 4: oocito ovulado. a) y b) Aspecto general de la superficie de un oocito ovulado, en donde se observa la membrana vitelina estratificada y el citoplasma del oocito. Puede verse claramente que la capa superficial de mayor electrodensidad, se ha completado (x 9000). c), d) y f) Detalle del proceso de oclusión y cierre del poro por donde pasaban las microvellosidades, ya retraídas, y el compactamiento de la capa superficial de la envoltura vitelina (x35000). mv: envoltura vitelina; ooc: oocito; flecha: capa de alta electrodensidad; punta de flecha: poro canal en proceso de cierre.



5.3. DINÁMICA OVÁRICA

Para llevar a cabo el recuento del número de células en los diversos estadios de crecimiento establecidos, se consideraron las OOG, OOC1, OOC2, OOC3, células en procesos de atresia y CMM. Debido a la enorme diferencia de tamaño existente entre las células germinales, y los oocitos en estadios finales de vitelogénesis, los conteos debieron realizarse con diferentes magnificaciones, dependiendo del estado de desarrollo ovárico.

Por este motivo, y dada la heterogeneidad de los valores obtenidos y la complejidad de un análisis estadístico con datos de estas características, los resultados solo indican la variación de las distintas poblaciones celulares a lo largo del año, no como valores absolutos, sino únicamente una tendencia, sin valor estadístico alguno.

La figura 32a muestra la variación anual de las diferentes poblaciones celulares. Los valores se expresan como proporciones relativas al total de células contadas por unidad de tiempo (bimestre). Los OOC3 se expresan en otra escala, debido a que, por su gran tamaño debieron ser contados en microscopio estereoscópico con diferente magnificación.

El estudio anual mostró que todos los estadios de la oógenesis, salvo los OOC3, se encuentran presentes, en distintas proporciones, durante todo el año.

En el caso de los OOG, sin embargo, se observa un aumento sustancial en su proporción durante los meses de marzo y abril; estos valores decrecen lentamente durante los meses de mayo y junio y sufren un leve incremento en julio-agosto para caer abruptamente durante la primavera (septiembre-octubre). Estos valores se mantienen bajos hasta marzo-abril, momento en que comienzan a incrementarse de nuevo al cumplir un ciclo anual.

Los OOC1, presentan una fluctuación estacional similar a la de las OOG, aunque con un desplazamiento en el tiempo, de aproximadamente uno a dos meses. La mayor proporción de OOC1 se observa durante los meses de mayo, junio y julio. A partir de este momento su número comienza a caer hasta llegar a valores mínimos en septiembre-

octubre. Durante los meses de verano, se observa un pequeño incremento, que no alcanza los valores observados en mayo-junio.

En el caso de los OOC2, se observa a lo largo del año un número bajo de células (no superan el 20% del total de elementos contados), con un único gran incremento durante los meses de septiembre-octubre. El pico de OOC2 posee pendientes muy marcadas y los valores caen a los niveles basales de manera abrupta al inicio del verano. El desfase temporal de este estadio respecto al pico de OOC1, es de aproximadamente tres a cuatro meses.

Los OOC3 (último estadio de crecimiento y maduración) son los únicos que no se encuentran presentes durante todo el año. Aparecen en el ovario hacia fines de agosto, su número (y tamaño) comienza a aumentar rápidamente hasta hacerse máximo en los meses de verano (enero-febrero). Pasado este punto, los valores descienden abruptamente hasta desaparecer en marzo-abril. Es necesario destacar nuevamente que debido al gran tamaño que presentan los oocitos en este estadio, debieron ser contados con otra magnificación, por lo cual su número está relativizado.

Finalmente, las variaciones estacionales de las atresias y de los CMM a lo largo del ciclo anual, se mantienen en proporciones relativamente bajas, aumentando levemente su número en los meses de invierno. La curva que corresponde a los CMM parece estar desplazada en el tiempo respecto a la de atresias. Aún así, ambos elementos se pueden observar durante todo el año, en especial los CMM.

Los índices gonadosomáticos (IGS) fueron calculados de acuerdo a la siguiente ecuación: $IGS = \text{peso de la gónada} / \text{peso total} \times 100$. Los IGSs máximos encontrados corresponden a los meses de verano (noviembre-febrero) con valores mayores a 6. Pasado este periodo los índices caen abruptamente hasta niveles basales ($IGS = 0.4$) y así se mantienen durante el otoño y el invierno para aumentar en primavera en forma marcada (figura 32b). La variación en los valores de los IGS mostró ser realmente importante entre los meses de invierno y los meses de primavera y verano, llegando a ser

15 veces mayor. Los desvíos estándar calculados fueron muy elevados respecto a los valores promedio. Pese a estas variaciones, la fluctuación del IGS a lo largo del año es muy marcada, delimitando netamente un periodo o temporada reproductiva acotado entre los meses de verano, y un periodo de reposo en otoño e invierno.

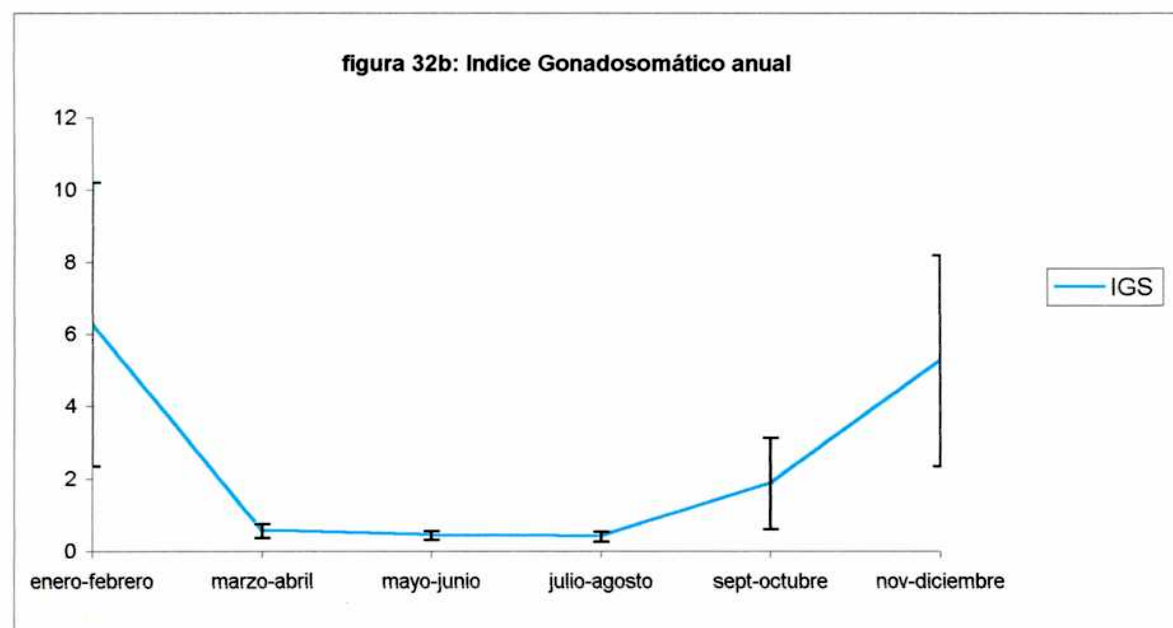
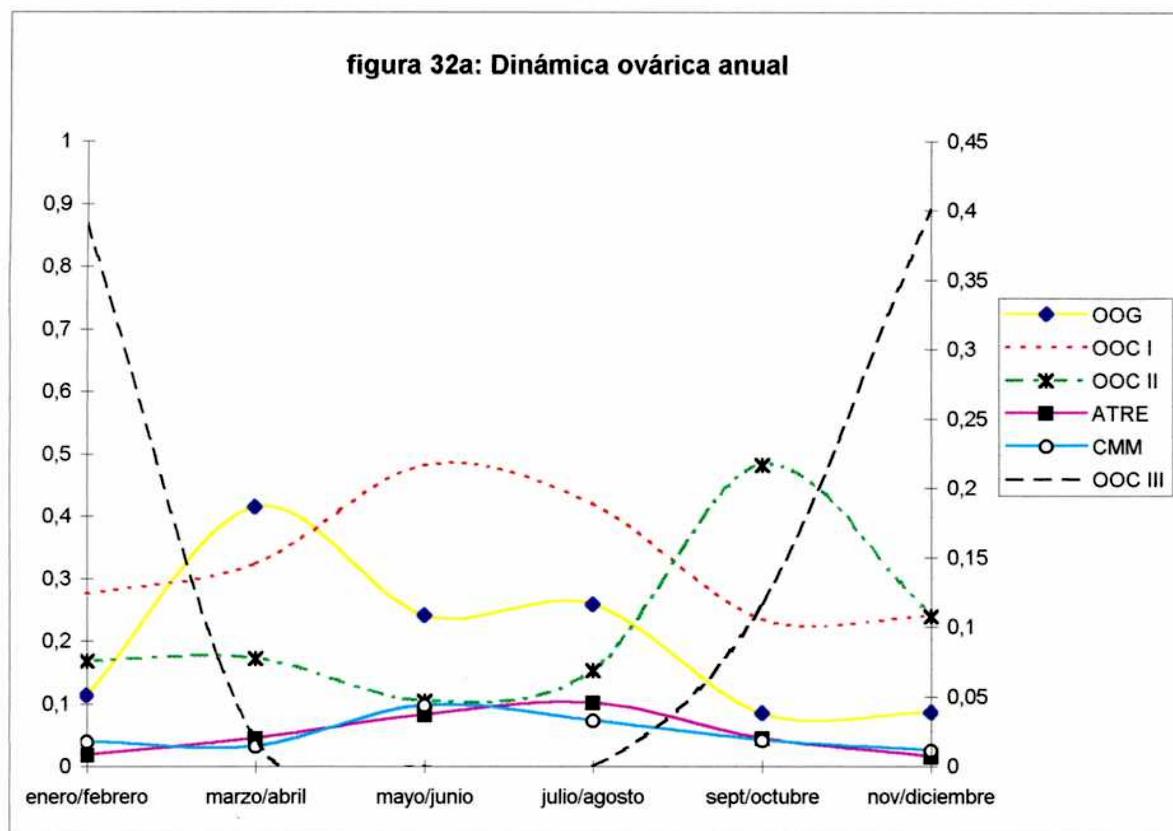


Figura 32: a) dinámica ovárica anual. Las líneas indican las variaciones estacionales de los diferentes estadios de la oogenesis, a lo largo del año. Los valores solo expresan una tendencia relativa. b) Índice gonadosomático estacional (IGS = peso gónada/peso total x 100).

6. DISCUSION Y CONCLUSIONES

6.1. OBTENCIÓN DE LOS EJEMPLARES

La anguila criolla es un pez teleosteo con una distribución zoogeográfica muy amplia y una abundancia relativa elevada. Gracias a algunas características anatómo-fisiológicas, ha logrado conquistar una gran variedad de ambientes muy distintos. Llega incluso a ocupar ambientes que, por sus características físico-químicas, hacen prácticamente imposible la existencia de otros peces. A modo de ejemplo pueden citarse cuerpos de agua permanentes, bajos y zanjas temporarias en donde el aprovisionamiento de agua se produce sólo gracias a lluvias aisladas, pantanos con limo y barro, en donde la gran cantidad de materia orgánica e inorgánica en suspensión disminuyen la concentración de oxígeno disuelto a valores que se encuentran muy por debajo de los niveles necesarios para el intercambio gaseoso de la mayoría de las especies de teleósteos. Se han capturado anguilas en pequeños charcos temporarios con escasa superficie y en donde dada la escasa profundidad (10 cm) y la gran exposición a la radiación solar, se mantenía el agua con temperaturas superiores a los 45° C. Por otro lado y como se comentó en la introducción, es frecuente encontrar anguilas enterradas a distinta profundidad en el lecho de arroyos temporarios y zanjones, cuyo cauce se había secado varios meses antes. La estructura de las cuevas fue bien estudiada por Lüling (1980) quien observó cuevas que penetraban el terreno hasta 2.5m para alcanzar el nivel de agua durante la estación seca. La estructura de los componentes horizontales y verticales es muy variable en la forma y diámetro de los túneles. La entrada puede estar tapada por algún objeto con el objeto de conservar la humedad (Atkinson & Taylor, 1991). La función más importante de las cuevas en especies que habitan en zonas litorales, es evitar la desecación. En el caso de la anguila criolla, se ha visto que pueden

resistir en sus cuevas periodos de sequía de hasta 9 meses (Graham, 1981). La única referencia bibliográfica que hace mención al lugar de oviposición y desarrollo de los juveniles, es en otro género del orden Synbranchiformes, *Amphipnous cuchia*, quien deposita sus huevos dentro de las cuevas en donde los juveniles pasan los primeros estadios de desarrollo (Das, 1946).

A lo largo de todas las salidas al campo llevadas a cabo durante el periodo de trabajo y experimentación, hemos visto que la anguila criolla es un pez cuya área de desplazamiento es más bien pequeña, teniendo como centro su cueva. A esta observación arribamos al observar como a los aproximadamente 20-30 días de haber capturado varios animales en un sector determinado de un arroyo el número de anguilas capturadas en esta nueva ocasión fue inferior al anterior, mientras que en zonas aledañas, el promedio de capturas continuaba siendo el normal para ese cuerpo de agua. En el caso de trabajar en ambientes discretos (juncales y zanjas aislados de cuerpos de agua de mayor tamaño, o pequeños arroyos de régimen pluvial) y con muestreos periódicos, hemos llegado a agotar temporalmente el recurso. Estas observaciones permiten sugerir las siguientes premisas: 1) que las poblaciones de estos animales en ambientes bien delimitados son discretas, 2) que los animales tienen un área de desplazamiento limitada, 3) que el recambio o repoblamiento de dichos ambientes ocurre principalmente después de grandes lluvias, o crecidas que conectan los distintos cuerpos de agua entre si y permiten el pasaje de animales, y/o como resultado de la multiplicación por reproducción. Las hipótesis propuestas implican de una u otra manera una lenta recuperación de los ambientes que han sufrido el impacto de las capturas. Esta merma de animales por efecto de captura, dificultó en todos los casos el muestreo programado en un mismo lugar ya que el número de ejemplares capturados mensualmente se hizo progresivamente menor.

A este problema de muestreo, se sumó el hecho de que durante los meses de invierno se dificulta la captura de anguilas, ya que los animales permanecen dentro de sus cuevas en estado de aletargamiento y con muy poca o ninguna actividad. Por este motivo, la captura periódica de animales durante periodos de tiempo prolongados

(mayores a un año) se vió comprometida y muchas veces arruinada. Esto dificultó la comparación en el tiempo del estado reproductivo de animales de una misma población o de una región en estudio.

Los acopiadores comerciales de anguilas poseen normalmente un gran número de animales en stock durante gran parte del año. La captura de estas grandes cantidades de animales (normalmente varios cientos) se realiza en el noreste y litoral argentino, y de allí son transportados por tierra hasta los puestos de venta en Buenos Aires. Existe un largo periodo entre el momento de la captura y su llegada al mercado. Por otro lado los animales son transportados y mantenidos en volúmenes muy reducidos con un alto grado de hacinamiento y sin prácticamente alimentación alguna. Por lo tanto y pese a disponer por este medio de suficiente cantidad de material biológico para las experiencias planificadas, el estado general, sanitario y reproductivo de los mismos se encuentra notablemente modificado por las condiciones estresantes de captura, transporte y almacenamiento. Por último y como ya se comentó anteriormente, los ambientes que habita esta especie, se caracterizan por estar sujetos a periódicas variaciones en el nivel de agua que llevan, llegando en algunos casos a la desecación total. En muchos casos los muestreos se vieron totalmente interrumpidos, dado que los animales permanecen enterrados hasta que las condiciones ambientales cambian.

El arte de pesca utilizada, resultó ser altamente eficiente dado que la recuperación de los animales fué en todos los casos excelente, sin sufrir prácticamente heridas de consideración. La selectividad del sistema (tallas capturadas) dependió exclusivamente del tamaño de los anzuelos utilizados, pero en todos los casos permitió obtener los animales de las tallas necesarias (desde 20 cm de largo total).

La adaptación de las anguilas mantenidas en cautiverio fué muy buena. Los animales colocados en la pileta con tierra, construyeron en el término de 24-48 hs cuevas en donde vivieron durante aproximadamente 3 años. Los ubicados en la pileta con trozos de tubos plásticos (utilizada generalmente como ambiente transitorio) en pocas horas se encontraban dentro de los tubos (hasta más de uno por tubo en algunos casos), e incluso

debajo de cualquier objeto que se colocara en la pileta y le permitiera estar oculto de la vista y en la mayor oscuridad.

Todos estos resultados muestran la gran capacidad de adaptación al transporte y al cautiverio, siendo muy interesante para el desarrollo de experiencias en condiciones controladas, que no impliquen estabilidad gonadal o estadios de reproducción. En cualquier proyecto de cría controlada (acuicultura) el tipo de adaptabilidad al cautiverio y la facilidad de manipulación, son factores de importancia en la elección de las especies de cultivo.

BIOPSIAS

La técnica utilizada para realizar las biopsias está basada en la utilizada por Chan *et al.* (1972) aunque con modificaciones, como el agregado, de 0.3 ml de Fudacaina 1% intramuscular en la zona de corte para disminuir el traumatismo generado por la incisión, una vez pasado el efecto de la benzocaína.

En su trabajo, Chan *et al.* (*op cit*) realizan la incisión en la pared del cuerpo de modo tal de afectar la parte media de la gónada, por lo cual, tras cortar la porción de tejido necesaria, deben unir por medio de una delicada sutura, las dos porciones de gónada, para restituir la circulación de la parte aislada y evitar la necrosis del tejido. En nuestro trabajo, al cortar el extremo cefálico de la gónada, se evita este problema, realizando una única ligadura para evitar la pérdida de fluidos. Por otro lado, las observaciones histológicas de la anatomía gonadal llevadas a cabo indican que no existen diferencias entre las regiones cefálica, media y caudal de la misma, concordando con datos de Chan y Phillips (1967a) en *Monopterus albus*. Estos resultados permitieron utilizar indistintamente cualquier porción de la gónada para los estudios histológicos.

El sistema de identificación de los animales por medio de marcas plásticas, demostró ser útil en plazos cortos, pues con el transcurso del tiempo y debido a los movimientos de los mismos las marcas se fueron desprendiendo por ruptura de la dermis.

6.2. ANATOMIA MACRO Y MICROSCÓPICA DEL OVARIO

La anatomía gonadal observada, corresponde básicamente a la descrita para los peces teleósteos. El ovario es de tipo sacular, y se forma por un repliegue de la gónada embrionaria que da origen a un saco. El epitelio ovárico (o germinal) deriva del epitelio celómico. Los oocitos son ovulados a la cavidad ovárica o lumen ovárico, en vez de hacerlo a la cavidad general del cuerpo, como ocurre en muchos vertebrados no teleosteos (Selman *et al.*, 1991).

El ovario ocupa aproximadamente 2/3 de la cavidad abdominal del animal. Esta característica, sumada a la gran sincronía observada en el ciclo reproductivo y en el desarrollo de los oocitos, hacen suponer la existencia de algún mecanismo especial de liberación de las gametas maduras. Como se vio anteriormente, los oocitos ovulados son acumulados en la cavidad o lumen ovárico, ubicada en la porción central del ovario y a lo largo de prácticamente toda su extensión. Para que esta gran cantidad de oocitos sea depuesta, en forma más o menos simultánea, debería pensarse en un mecanismo de compresión sincrónica del ovario, de tipo peristáltico, comparable a los movimientos del tubo digestivo de la mayoría de los vertebrados. Estos movimientos se iniciarían en la zona cefálica o anterior del ovario y terminarían en la porción caudal, donde se encuentra la papila urogenital, permitiendo de esta manera la total liberación de los oocitos. Este mecanismo requiere para su funcionamiento de una malla o red de elementos contráctiles dispuestos en forma ordenada en la envoltura ovárica.

El estudio histológico de la vaina ovárica de la anguila, puso en evidencia una capa de células musculares lisas de espesor variable que podrían cumplir el rol contractil propuesto. El estímulo nervioso necesario para la contracción rítmica y sincrónica de la envoltura ovárica, estaría dado por los nervios amielínicos encontrados en la vaina muscular. Un modelo similar ha sido propuesto para el pez aguja, *Syngnathus scovelly* (Begovac & Wallace, 1987), y para el hipocampo, *Hippocampus erectus* (Selman *et al.*,

1991). En estas especies los huevos son fertilizados y depuestos en el saco incubatriz del macho, mientras la hembra y el macho nadan juntos. Esto requiere un sincronismo de puesta muy preciso y coordinado. Para que esto ocurra el mecanismo de puesta estaría controlado, en los Syngnatidos, por un estímulo nervioso de contracción de la pared ovárica, que se iniciaría en la zona craneal y terminando en la zona caudal, “empujando” los oocitos ovulados hacia el oviducto. La gran cantidad de células musculares lisas y la gran cantidad de fibras colágenas encontradas en la vaina ovárica, así como la multidireccionalidad de las mismas, son similares a las encontradas en los syngnathidos (caballitos de mar y peces aguja) (Selman *et al.*, 1991) que también poseen gónadas alargadas antero-posteriormente. A pesar de toda la evidencia disponible, la comprobación de esta hipótesis debería realizarse mediante la implementación de experiencias de electrofisiología.

La gran disminución del diámetro de la vaina de recubrimiento del ovario durante el periodo previo y durante la reproducción ocurre en respuesta a la presión provocada por el significativo aumento del número y tamaño de los oocitos en esta época. En contraposición, durante los meses de reposo (otoño-invierno) el diámetro de la misma aumenta considerablemente debido al relajamiento de las fibras contráctiles. Este proceso comienza al poco tiempo de la ovipuesta. Esto indica que las variaciones encontradas son cíclicas y anuales.

EPITELIO GERMINAL

La disposición de las células germinales en el ovario de los teleósteos parece ser muy variada. A la porción de tejido gonadal que contiene a las células germinales se le ha dado el nombre de “epitelio germinal”. La ubicación de esta porción de tejido es poco clara (en las pocas especies de peces teleósteos en que ha sido estudiado) y no se ha podido establecer aún en forma precisa su origen concreto.

Según Grier (1999), la definición de epitelio germinal, debe contemplar las mismas características que cualquier epitelio: (1) las células deben estar conectas

lateralmente por desmosomas, uniones estrechas y/o uniones tipo “gap”; (2) en su superficie apical, las células deben bordear superficie corporal, una cavidad o estar en contacto directo o indirecto con el exterior, (3) todas las células del epitelio están soportadas por una membrana basal continua.

En la literatura se define al oocito de dos formas diferentes: en la primera la ovogénesis comienza cuando la oogonia entra en leptotene de la profase de la primera división meiótica y se transforma en oocito (Selman & Wallace, 1989). Este proceso está precedido por la duplicación del ADN y por la condensación y apareamiento de los cromosomas homólogos. Más tarde los oocitos se arrestan en diplotene y comienzan su crecimiento. En la segunda definición se considera al oocito sólo como un “ooplasma rodeado de un oolema y una zona radiata (envoltura vitelina)” (Tyler & Sumpter, 1996). Grier (1999) considera que esta última definición es incompleta y poco precisa, y debe ser descartada, dado que no contempla a la célula meiótica dentro del epitelio germinal y al desarrollo que sufre previo a la finalización de la foliculogénesis y a la formación del corion. El oocito debe ser considerado como la oogonia que ha iniciado los procesos de meiosis.

El origen de las células germinales y foliculares propuesto por diversos autores es variable. Las células mesenquimáticas y las células epiteliales del ovario han sido propuestas como originadoras de las células prefoliculares en una gran variedad de peces. Sin embargo estudios ultraestructurales llevados a cabo en el pez aguja (*Syngnathus scovelli*) al microscopio óptico indican que tanto las oogonias como las células prefoliculares derivan directamente de una porción restringida del ovario (Begovac & Wallace, 1987). Las células de la teca sin embargo tendrían un origen distinto. Selman y Wallace (1989) señalan al tejido conectivo del estroma ovárico, como productor de células tecaes.

En los syngnatidos (caballitos de mar y agujas de mar), el tejido germinal se encuentra restringido al borde de la lamela ovárica y ha sido llamado borde germinal (germinal ridge) (Begovac & Wallace, 1987). En esta porción de tejido se alojan las

células germinales primordiales y se originan las células somáticas que darán origen a las células foliculares. Recientemente Grier (1999) ha descrito en *Centropomus undecimalis*, un detallado y muy completo estudio ultraestructural sobre el epitelio germinal, arrojando evidencia clara sobre la localización original de las células germinales y la estructura del folículo ovárico, apoyando la evidencia antes planteada para los Syngnátidos. En el caso de *Fundulus heteroclitus* (Wallace, 1985) sin embargo, no existe evidencia alguna de que los epitelios externos o internos del ovario tengan una estructura similar al epitelio germinal descrito por Grier (1999). Por el contrario en esta especie las oogonias y los oocitos más pequeños se encuentran inmersos en todo el estroma ovárico.

La identificación de las oogonias al microscopio óptico es muy difícil y ha sido objeto de muchas revisiones. Sin embargo la única estructura que puede ser utilizada como marcador de oogonias y oocitos en estadios iniciales de crecimiento, así como de espermatogonias y espermatocitos, es el “nuage” (Hamaguchi, 1993, Grier, 1999), exclusivo de estos tipos celulares. Debido a esto, es necesario recurrir al microscopio electrónico de transmisión, para poder encontrar el origen de las oogonias y poder diferenciar, gracias a las características nucleares antes mencionadas, los oocitos en sus primeros estadios de desarrollo.

Un punto importante a discutir, es el concepto de folículo ovárico. Tradicionalmente se ha considerado al folículo ovárico como una estructura compuesta por el oocito, la envoltura vitelina (en caso de haberse desarrollado), las células foliculares y las células tecales. Esta definición siempre fue considerada desde el punto de vista funcional y estructural, debido al íntimo contacto que existe entre las distintas células y a la estrecha relación endócrina que mantienen. Selman y Wallace (1989) describen un folículo multilaminar, consistente en el oocito rodeado por las células foliculares, la membrana basal, una capa tecal vascularizada y un epitelio de superficie. Tyler & Sumpter (1996) no consideran la membrana basal en su definición de folículo. Redding y Patino (1993) consideran la membrana basal pero no el epitelio de superficie.

De manera generalizada, y pese a estas diferencias menores, se considera a la teca como parte del folículo. Sin embargo el trabajo recientemente publicado por Grier (1999) analizando el epitelio germinal de *Centropomus undecimalis*, plantea cambios radicales en el concepto de folículo, considerando en su estructura únicamente al oocito y la envoltura vitelina, ambas derivadas del epitelio germinal, mientras que la/s teca/s tienen su origen en el estroma ovárico.

En la anguila criolla el tejido germinal se encuentra dispuesto principalmente sobre toda la superficie interna de la lamela ovárica, siendo comparable al tipo encontrado en *F. heteroclitus*, aunque se halla restringido a la región interna de la lamela. La localización cierta de las células germinales y de las células prefoliculares en *S. marmoratus* es todavía un tanto especulativa, debido a que los estudios realizados a nivel de microscopía óptica no son suficientes para aclarar su estructura. Sin embargo algunas observaciones realizadas a nivel de microscopía electrónica parecen indicar, que en nuestra especie, el patrón de diferenciación oogonia-oocito sigue los lineamientos generales descritos recientemente en otras especies de teleosteos y que al parecer sería un patrón generalizado no solo para peces, sino también para mamíferos (Grier, 1999). Este nuevo concepto de folículo tiende a unificar la clasificación en todos los vertebrados ya que es coincidente con la estructura ovárica descrita para sauropsidos y mamíferos (Zamboni, 1972).

Actualmente estamos desarrollando un minucioso análisis a nivel de microscopía electrónica en muestras de ovarios en diferentes etapas del ciclo gonadal, principalmente a nivel de la zona luminal de la lamela ovárica, con el objeto de caracterizar las diferentes etapas de la meiosis, lo que pondrá en evidencia la localización original y el desarrollo de la línea germinal femenina en *S. marmoratus* (Ravaglia y Grier, en preparación).

OOGENESIS

El estadio inicial considerado en el estudio de la gametogénesis es el de las células germinales (oogonias y espermatogonias). Estos tipos celulares se originan a partir de las células germinales primordiales y al microscopio óptico son iguales e indistinguibles.

Las oogonias sufren primero un proceso de multiplicación celular por mitosis y se transforman en oocitos primarios solo cuando los cromosomas se arrestan en diplotene de la profase de la primera división meiótica. En este proceso, las células prefoliculares comienzan a rodear por medio de procesos citoplasmáticos a cada oocito dando lugar a un folículo primordial. Es muy difícil identificar positivamente los oocitos que recién han entrado en leptotene, de las oogonias. Begovac y Wallace (1988), señalan que la pérdida del anillo perinuclear de mitocondrias y la aparición de complejo de Golgi darían indicios de la transformación de oogonia en oocito. Simultáneamente el núcleo de los oocitos en leptotene se hace más esférico respecto a aquellos de las oogonias, más elípticos. Estos núcleos contienen granulaciones densas y la cromatina permanece electrodensa. Los oocitos en zygotene y paquitene son más fácilmente distinguibles debido a la aparición de complejos sinaptonémicos dentro del núcleo. Begovac y Wallace (1988) también señalan, en *Syngnathus scovelli*, que la aparición de múltiples nucleolos en el oocito, coincidiría con la formación definitiva del folículo ovárico, y su separación del epitelio germinal. En este punto el folículo se encuentra formado por el oocito, rodeado por una capa de células foliculares y separados del resto del tejido por una membrana basal. Posteriormente las células tecales provenientes del estroma ovárico, formarán la teca.

La clasificación del folículo ovárico propuesta por Grier, como una unidad tripartita de origen embriológico común, resulta interesante. Sin embargo la inclusión de la membrana basal como una estructura individual resulta a mi entender inapropiada, ya que a nivel histológico, ésta es una formación intrínseca al concepto de epitelio, y como tal inseparable, por lo que no puede ser considerada como un elemento individual que caracteriza al folículo, resultando entonces el folículo en una estructura bipartita.

Los oocitos detenidos en profase de meiosis I inician, a diferencia de las gametas masculinas, una etapa de crecimiento cuya duración varía en las distintas especies, y que está causada principalmente por la acumulación de sustancias de reserva para el posterior desarrollo del embrión. En el caso de las anguilas la cantidad de material acumulado llega a ser muy importante y comparable al de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), en donde el oocito primario, que mide aproximadamente 20µm alcanza al final de la vitelogénesis diámetros medios de 4mm (Nagahama, 1983).

Los estadios iniciales de crecimiento oocitario, están caracterizados en todas las especies, por una intensa síntesis de ARN. Este hecho ha recibido particular atención en los anfibios donde se vió que la cantidad total de ARN presente al final del crecimiento oocitario es la misma que la observada en las etapas de crecimiento primario (Wallace & Selman, 1990). Existe muy poca información acerca de la síntesis de ARN en peces teleósteos.

La característica más visible e interesante del proceso de crecimiento es la etapa de vitelogénesis. Como en el resto de los animales ovíparos, el vitelo es un componente muy importante en la constitución de los oocitos. En los peces teleósteos, se han considerado tres diferentes tipos de estructuras relacionadas con el vitelo: gotas lipídicas, los alveolos corticales y glóbulos de vitelo. En la anguila criolla, las gotas lipídicas, son las primeras estructuras vitelogénicas en aparecer dentro del oocito, en la zona perinucleolar, y van migrando hacia la periferia en estadios posteriores. La secuencia de aparición de las distintas formas de vitelo, varía entre las especies. Los alveolos corticales, típicamente PAS positivos, aparecen en la anguila criolla en forma casi simultánea con las gotas lipídicas, de aspecto vacuolar en material fijado en soluciones de base alcohólica. Estudios llevados a cabo con microscopía electrónica por Shackley & King (1977) y por autorradiografía y análisis electroforético de oocitos en vitelogénesis (Selman *et al.*, 1986) revelaron la posible participación del aparato de Golgi y del retículo endoplasmático rugoso en la formación de los alveolos corticales. Estos resultados sugieren que estas son sintetizadas dentro del oocito. A medida que el oocito

crece, los alveolos corticales, aumentan en tamaño y en número, y se desplazan hacia la zona cortical del oocito en donde se acumulan (Wallace & Selman, 1981). Ha sido bien establecido que una de las funciones de los alveolos corticales durante la reacción cortical en la fertilización, es la de liberar su contenido en el espacio perivitelino cuando el huevo es fertilizado, formando la membrana de fecundación y evitando de esta manera la polispermia (Nagahama, 1983; Kudo, 1991). Algunos estudios inmunohistoquímicos y citoquímicos, han puesto en evidencia que el principal componente de los alveolos corticales, es una polisialoglicoproteína de 200K-Da. Los trabajos llevados a cabo con microscopia electrónica de transmisión, indican que la estructura de los alveolos corticales y las llamadas vesículas vitelinas son muy similares en estructura, origen y composición. Por este motivo y en base a la evidencia es conveniente unificar criterios y eliminar la gran cantidad de nombres asignados a la misma estructura (vesículas vitelinas, vitelo endógeno, vitelo intravesicular, vacuolas vitelinas, glóbulos de vitelo primario, etc.) y simultáneamente asignarle un nombre que haga referencia clara a su función específica, descartando en particular todo aquel que haga referencia al vitelo. De esta manera sería útil adoptar la terminología propuesta por Selman y Wallace (1989) de “alveolos corticales primordiales” o simplemente “alveolos corticales”.

La envoltura vitelina en la anguila criolla aparece en el estadio de crecimiento primario (OOC1). Estos datos concuerdan con las descripciones propuestas por Hyllner *et al.* (1991) para la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en donde, utilizando técnicas inmunohistoquímicas se puso en evidencia que la deposición de proteínas de la envoltura vitelina se inicia en forma previa a la activa incorporación de vitelogenina por parte del oocito.

En su desarrollo incipiente, se han identificado dos capas o bandas, de alta y baja electrodensidad respectivamente. dichas bandas concuerdan con las descritas por varios autores para el desarrollo inicial de la envoltura vitelina de teleósteos y aún de anfibios (Yamagami *et al.*, 1992). A medida que continua el desarrollo del oocito, la envoltura de

la anguila pierde dicha estructura y aparece un nuevo ordenamiento que responde a una disposición de hasta 30 capas alternadas de mayor y menor densidad.

Este tipo de ordenamiento no responde al observado en el pez aguja (*S. scovelli*) en donde se identifican en estadios medios de vitelogénesis, tres capas bien diferentes, llamadas de afuera hacia adentro Z1, Z2 y Z3 que sufren posteriormente una condensación de las capas Z2 y Z3 principalmente (Begovac & Wallace, 1988). Por otro lado en *F. heteroclitus*, Selman y Wallace (1986) describen un desarrollo de la envoltura vitelina muy similar al de la anguila criolla.

ATRESIAS

Como ya se comentó oportunamente, las estructuras atrésicas son elementos muy comunes en los ovarios de los peces teleósteos, y su origen puede ser variable. El proceso de atresia ha sido descrito en forma muy clara por van den Hurk & Peute (1979) en la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). Estos autores han dividido el proceso en cuatro estadios consecutivos. En el primero de ellos, llamado α , el oocito pierde contacto con las células de la granulosa. El núcleo se disgrega y se mezcla con el citoplasma. Las células de la granulosa proliferan profusamente, ingresan dentro del oocito y comienzan a reabsorber su contenido. En el estadio β , todo el vitelo ha sido reabsorbido por las células foliculares. El estadio γ , comprende a los folículos que se ha achicado debido a la disminución de tamaño de la capa folicular. Muchas células foliculares tienen apariencia necrótica. En el último estadio, el δ , el folículo tiene un aspecto redondeado aunque irregular, y está formado por células foliculares necróticas, macrófagos libres, y pigmento amarillo (lipofuscinas principalmente), este último estadio corresponde al que hemos considerado como CMM para la anguila criolla, y cuyo origen, localización y función en los teleósteos se discute a continuación.

6.3. CENTROS MELANO MACROFAGICOS (CMM)

Los CMM se han descrito como parte del sistema inmune de los peces teleósteos y son agregados discretos de células densamente empaquetadas, o grupos celulares conteniendo inclusiones heterogéneas. Histoquímicamente estas células, contienen en su mayoría melanina (compuesto que actúa para proteger a las células de los rayos UV), hemosiderina (residuo proveniente del metabolismo de la Hemoglobina) y lipofuscinas (pigmento comunmente presente en células con cierto grado de envejecimiento) (Herraez & Zapata, 1986, 1991; Wolke *et al.*, 1985; Macchi *et al.*, 1992). El origen y rol bioquímico de dichos pigmentos es muy variable y poco conocido aún (Lavagno *et al.*, 1992; Wolke *et al.*, 1985; Pearse, 1985; Bancroft & Stevens, 1990). Es común encontrar estas estructuras en tejidos hematopoyéticos y otros tejidos blandos (Roberts, 1975; Agius & Agbede, 1984). Los principales sitios de localización de estas “células con inclusiones pigmentadas” en la mayoría de los peces (excepto salmónidos) son el estrato esponjoso de la dermis, la hipodermis, el bazo, el hígado, el riñón y en pequeños grupos a lo largo de los vasos sanguíneos y linfáticos (Roberts, 1975; Agius & Roberts, 1981). Más recientemente se ha descrito su presencia en bránquias, gónadas y corazón (Ferguson, 1989; Macchi *et al.*, 1992; Besseau & Faliex, 1994; Nakamura *et al.*, 1992, 1993; Nakamura & Shimozawa, 1994; Ravaglia & Maggese, 1995).

La función básica de los CMM tradicionalmente descritos, es la de fagocitar y remover partículas extrañas y/o elementos residuales producto de la degradación celular. Melano macrófagos aislados han sido considerados como característicos y exclusivo de peces primitivos (Ardavin & Zapata, 1987) y elasmobranquios (Zapata, 1983; Agius, 1980, 1985), mientras que los cúmulos o empaquetamientos de macrófagos estarían presentes únicamente en peces teleósteos superiores (Ellis *et al.*, 1976; Agius, 1979; Macchi *et al.*, 1992). Se ha comprobado que su morfología, composición y actividad, varían en condiciones tales como largos períodos de inanición (Agius & Roberts, 1981), (Brown & George, 1985), el desarrollo de determinadas enfermedades (Roberts, 1975), muerte y degradación tisular (Agius, 1979), variaciones en los niveles de contaminación

acuática (Macchi *et al.*, 1992; 1993) y como respuesta a determinados mecanismos de defensa (Ellis *et al.*, 1976; Ferguson, 1989).

Los estudios histoquímicos llevados a cabo han dado resultados muy variables. Estas células pueden dar coloraciones desde débiles hasta muy fuertes con PAS (Ácido Periódico de Schiff). Por otro lado, los resultados de las técnicas para evidenciar la presencia y abundancia relativa de hierro, lipofuscinas y melanina, (como ser Schmorl, Long-Ziehl Neelsen, Sudan Black B) (Pearse, 1985), varían dependiendo del tejido y de la especie en estudio (Herraez y Zapata, 1991; Micale y Perdichizzi, 1990, Roberts, 1975). A pesar de todas estas características y los ensayos llevados a cabo, muchos aspectos de la morfología, origen y posible función de los CMM son todavía escasos (Herraez & Zapata, 1986).

Los CMM han sido ocasionalmente descriptos en peces como acumulaciones muy compactadas de células fagocíticas altamente pigmentadas (Meseguer *et al.*, 1994). Las observaciones histoquímicas acerca de dichas estructuras son muy variables y a veces hasta contradictorias. No sólo las características ultraestructurales son escasas, y se refieren casi exclusivamente a las encontradas en bazo, hígado y riñón, sino que el origen, función y destino de muchos pigmentos celulares es aún tema de gran debate.

Meseguer *et al.* (1994) sugieren que dichos CMM serían un tipo particular de granuloma formado por células mononucleares fagocíticas en circulación que han fagocitado determinados materiales extraños. Esta hipótesis implicaría la presencia de macrófagos moviéndose libremente por el parénquima de los tejidos linfo-hemopoyéticos y hepáticos hasta formar finalmente grandes grupos de células encapsuladas (CMM). Según observaciones de Meseguer *et al.* (1994), los macrófagos que componen estos agregados son ultraestructuralmente similares a los monocitos macrófagos encontrados en sangre, riñón cefálico y exudados de peritoneo (libres y agregados) de la misma especie aún después de fagocitar partículas de carbón.

Respecto al encapsulamiento de estos grupos celulares, la evidencia existente sugiere que sería una forma de aislarlas del tejido circundante. La cápsula consistiría en

aquellos CMM de gran tamaño, envueltos por una capa de células planas, similares a las células reticulares fibroblásticas encontradas en el riñón cefálico de *Dicentrarchus labrax* (Meseguer *et al.*, 1994).

Un mecanismo similar ha sido propuesto por Meseguer *et al.* (1994) para los macrófagos de tejidos linfopoyéticos. De acuerdo a sus estudios, tras ingerir melanina, las células migrarían a través del parénquima de estos tejidos como macrófagos libres. Posteriormente se agregarían en pequeños cúmulos formando los CMM.

La bibliografía indica la presencia de tres tipos básicos de pigmentos acumulados en el citoplasma de estas células. Lipofucsina, hemosiderina y melanina. En general dichos pigmentos se encuentran presentes en forma simultánea, aunque en diferentes proporciones, dependiendo del tejido y del estado fisiológicos del animal (Agius, 1985). La lipofucsina sería la más común y abundante en los peces en general (Agius & Agbede, 1984; Herraiz & Zapata, 1991). La hemosiderina se considera el producto final de la degradación de hemoglobina por fagocitosis de eritrocitos, lo que originaría el aumento considerable de ión férrico (proveniente del grupo hemo) como componente principal de este pigmento.

El origen de la melanina localizada en los CMM es todavía muy discutido. Sin embargo se sabe que las células melano-macrofágicas incorporan melanina por fagocitosis de melanocitos y melanóforos (Agius, 1985). Por otro lado algunos estudios bioquímicos indican la presencia en CMM de tirosinasa, lo cual sugeriría la posibilidad de biosíntesis de melanina (Zuasti *et al.*, 1989). Sin embargo Herraiz y Zapata (1991) no han encontrado, a nivel ultraestructural, evidencia alguna de la “maquinaria” necesaria para llevar a cabo dicha síntesis.

En nuestros ensayos, los resultados obtenidos proveen evidencia muy clara sobre la posible naturaleza de los pigmentos observados en las estructuras en estudio. La fuerte reactividad de la coloración de Schmorl obtenida (para detectar lipofucsinas y melanina), la débil positividad de la reacción de Long Ziehl-Neelsen (para detectar ceroides) y la intensa fluorescencia observada, sumada a la persistencia de las granulaciones, al pasaje y

lavado por diversos solventes lipídicos, durante parte de las coloraciones, indicarían que las células contendrían en su interior al menos un tipo de lipofucsina con un alto grado de oxidación. A pesar de que la reacción de PAS, generalmente utilizada para caracterizar lipofucsionas y ceroides, dió levemente positiva, no sería contraria al resto de las coloraciones dado que según algunos autores los mecanismos histoquímicos de dicha coloración no han sido aún esclarecidos (Bancroft & Stevens, 1990; Pearse, 1985).

Los ensayos realizados para detectar melanina en las estructuras ubicadas en las gónadas, indican la presencia de dicho pigmento, aunque por el bajo grado de reactividad, la concentración del mismo sería menor que las detectadas en hígado y bazo (tejidos usados como control positivo de la técnica).

En estadios de formación reciente, los CMM de las gónadas se observan voluminosos, con citoplasmas abundantes y contenidos heterogeneos. A nivel macroscópico, esto se traduce en coloraciones pardo claras y amarillentas, de aspecto graso. Al ser iluminados con luz ultravioleta demuestran un alto grado de fluorescencia color naranja y dorado. A medida que transcurre el tiempo, el cúmulo celular se va condensando hasta finalmente identificarse como pequeñas esferas compactas, color marrón oscuro o negro. Los macrófagos que componen estos estadios se encuentran densamente empaquetados, con citoplasmas muy reducidos, contenidos citoplasmáticos de aspecto más homogéneo y escasa autofluorescencia. Por lo tanto la antigüedad y el estado de envejecimiento del cúmulo celular puede estimarse en forma aproximada en base al grado de compactación de las células que lo componen, a la coloración del mismo, así como de la intensidad de fluorescencia que presentan las lipofuscinas presentes en el citoplasma.

Las observaciones realizadas en *S. marmoratus*, indican variaciones en el número, composición y tamaño de los CMM a lo largo del año. Pasado el período reproductivo se observa su incremento en número y tamaño. Durante la etapa de regresión gonadal presentarían una mayor actividad contribuyendo en la degradación de oocitos atrésicos,

de restos de folículos ovulados, y en el caso de los machos de células residuales del ciclo espermático. Esta variación en el número de estructuras coincide con el período en donde se observa un mayor número de atresias, sugiriendo una relación directa entre ambas.

Imágenes similares pueden observarse a lo largo del período de reversión sexual, en donde los macrófagos intervendrían en la degradación de los restos de tejido germinal femenino, así como en la remodelación del tejido conectivo que conforma el parénquima gonadal permitiendo la reestructuración de la gónada durante el cambio de sexo.

El hecho de que los CMM identificados en las gónadas no se hallen necesariamente asociados a vasos linfáticos y/o sanguíneos, indicaría que su función no estaría relacionada directamente con la captura y remoción de partículas extrañas circulantes en sangre, como sugieren Macchi *et al.* (1992) en la corvina de boca blanca (*Micropogonias furnieri*). Esto apoyaría la hipótesis de reabsorción celular planteada en el párrafo anterior.

Dado que en la anguila criolla, el pasaje de hembra a macho durante la reversión sexual es un proceso continuo, y que estos corpúsculos pueden acumularse y permanecer en los tejidos durante un período prolongado, es difícil, en el caso de los machos secundarios, conocer el origen de los mismos, ya que pueden haberse formado y acumulado durante la fase sexual femenina y/o de intersexo, y no corresponder a procesos de reabsorción y “limpieza” de los testículos propiamente dichos. Chan *et al.* (1967) describen en las gónadas de ejemplares hembra, de intersexo y macho de *Monopterus albus* (Pisces, Synbranchidae) la presencia de una serie de estructuras densamente pigmentadas a las que llaman “brown bodies”. Estos autores sugieren que las mismas “serían estadios regresivos finales de células que se desintegran durante la atresia folicular” y que finalmente “el estadio terminal de todos los folículos sería un cuerpo marrón”.

A pesar de que la descripción histomorfológica de las estructuras de especies tan emparentadas taxonómicamente, es muy similar, las coloraciones histoquímicas indican que al menos en *S. marmoratus* las mismas no corresponden exclusivamente a estadios

finales de procesos de atresia folicular, sino estructuras relacionadas en forma directa, con la degradación de diversos tipos celulares.

Esta última hipótesis se basa en la presencia durante todo el año de CMM en testículos bien desarrollados de especies con sexos separados (gonocóricas) (Sadovy & Shapiro, 1987; Ravaglia *com pers*) y en la porción testicular de hermafroditas simultáneos (Ramírez, 1984; Ravaglia y Maggese, 1995).

Por otro lado, la anguila criolla, por ser una especie hermafrodita de tipo protogínico diándrico, presenta dentro de su población un pequeño porcentaje de machos cuyos testículos se desarrollan en forma directa durante el desarrollo embrionario, es decir, que sus gónadas nunca han pasado por etapas femeninas (Liem, 1968; Sadovy & Shapiro, 1987). En los testículos de estos machos han podido identificarse frecuentemente CMM con características similares a las descritas, lo que contradice las hipótesis que asocian a los CMM exclusivamente con la degradación de oocitos.

Los resultados expuestos señalan que las estructuras encontradas en las gónadas de *S. marmoratus* son CMM formados entre otros elementos por las células foliculares del folículo ovulado, granulocitos y células fagocíticas del sistema mononuclear, con características básicas y función semejantes a aquellos descritos en bazo, riñón, corazón e hígado (Macchi *et al.*, 1993; Meseguer *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 1993; Nakamura & Shimozawa, 1994). El mecanismo de acción de estas células, podría ser similar al descrito por Herraiz y Zapata (1986) y Ellis *et al.* (1976) en el hígado de *Carassius auratus*, en donde los macrófagos libres del sistema retículo endotelial migrarían hacia las células o estructuras atrésicas y ayudarían a su fagocitosis y reabsorción. Posteriormente se acumularían formando los CMM. Con el tiempo irían perdiendo su actividad fagocítica, incrementando simultáneamente su densidad y color. Actuarían no solo como “células limpiadoras de atresias o barrenderos celulares” sino también en

procesos de defensa contra parásitos, reabsorción de esperma, y degradación de tejidos no específicos (Atz, 1964; Sadovy & Shapiro, 1987; Warner, 1975; Roede, 1972).

6.4. OOGÉNESIS Y DINÁMICA OVÁRICA

La escala de crecimiento oocitario fué diseñada teniendo en cuenta los eventos citológicos más relevantes considerados para la mayoría de los peces óseos en los cuales se han llevado a cabo estudios similares. Sin embargo la literatura existente, muestra numerosas tablas, escalas y divisiones del proceso de oógenesis muy distintas entre si (Wourms, 1976; Selman & Wallace, 1986, 1989; Casadevall *et al.*, 1993; Foyle, 1993; Jackson & Sullivan, 1995; Tyler & Sumpter, 1996; Kjesbu, *et al.*, 1996). Esta gran variación es comprensible, si partimos de la base que la gametogénesis femenina es un proceso continuo, y que la división en categorías es solo una herramienta de trabajo totalmente arbitraria. En nuestro caso la asignación de categorías en el crecimiento oocitario se llevó a cabo para la cuantificación relativa de cada estadio a lo largo del año.

IGS Y DINAMICA OVARICA

El índice gonadosomático (IGS) calculado a lo largo del año, indica claramente que esta especie posee un periodo reproductivo amplio, comprendido entre los meses de noviembre y marzo. Sin embargo los grandes desvíos estandar observados en los meses de Septiembre-octubre y marzo-abril, indican que el inicio de la vitelogénesis así como el final del periodo reproductivo tienen límites bastante amplios. Estas variaciones pueden deberse entre otros factores a las grandes diferencias térmicas y ambientales de los variados lugares de origen de los animales estudiados. Por otra parte la forma de vida de esta especie, que se caracteriza por colonizar ambientes con condiciones muy inestables (charcos con regímenes de agua transitorios, grandes amplitudes térmicas diarias etc.) hacen que los ejemplares no presenten una sincronización exacta. Los provenientes de

zonas más cálidas (Corrientes y Chaco) con temperaturas anuales medias altas y homogéneas, presentan periodos reproductivos más tempranos y ligeramente más prolongados que los de zonas más templadas (provincia de Buenos Aires) en donde la amplitud térmica promedio de la región es significativamente más elevada, y en donde los periodos invernales son largos y con bajas temperaturas, en muchos casos incluso por debajo del punto de congelación .

Por otro lado, la regularidad de la curva así como la falta de variaciones durante la fase reproductiva, señalan la existencia de una única ovipuesta en el año. Las observaciones histológicas realizadas en ovarios maduros, así como el hallazgo de un animal con un ovario ovulado, pero aún no ovipuesto, confirman esta hipótesis. Esta evidencia describe a la anguila criolla como un ovipositor total anual, o de acuerdo con la clasificación de Wallace y Selman (1981), como un pez con ovario de tipo sincrónico por grupos. Esto significa que en cualquier momento del año pueden encontrarse principalmente dos camadas de oocitos distintas. Una en estado de latencia o reserva, y otra que se encuentra en proceso de crecimiento y que será ovulada durante el periodo reproductivo próximo.

La variación en los valores de IGS mostró ser realmente importante entre los meses de invierno, con IGS promedio de 0.4, y los meses de primavera y verano, con IGS de 3.57. Esta gran variación corresponde a la gran acumulación de vitelo y concuerda con los valores descriptos para muchas especies con crecimientos oocitarios similares (Nieland & Wilson, 1993). La cantidad de vitelo en los oocitos depende en gran medida no sólo de la especie, sino del hábitat en que vive el pez. Las especies con huevos bentónicos, en general presentan mayor cantidad de vitelo que aquellas con huevos planctónicos, que acumulan mayor cantidad de gotas de lípidos, para favorecer la flotabilidad de los mismos. En el caso de *S. marmoratus* se desconoce su comportamiento de puesta y desarrollo de los huevos. sin embargo se supone que estos son depuestos en cuevas y que es allí en donde se verifica el desarrollo embrionario, la eclosión y las primeras etapas de vida de las larvas. Confirma esta observación el haber

registrado la presencia de larvas y juveniles inmersas en el barro que rodea los cuerpos de agua (datos no publicados).

El análisis cuantitativo de los diferentes estadios de la gametogénesis llevado a cabo a lo largo de un año, muestra en forma muy clara cómo una población celular es reemplazada por la población sucesiva en el proceso de oogénesis. Dado que este proceso es un ciclo continuo, es necesario iniciar su análisis en un punto arbitrario.

Pueden reconocerse y/o establecerse cuatro periodos básicos de actividad ovárica. El primero, si iniciamos el estudio durante los meses de mayo-junio, corresponde al periodo conocido como de **reposo gonadal** (Rinchard *et al.*, 1998). El IGS corresponde en este estadio a los valores basales. Estos periodos están regulados por factores intrínsecos (hormonales) y extrínsecos (ambientales) y varían entre las especies pudiendo ser cortos o relativamente largos (Rinchard *et al.*, 1998). La etapa de reposo, que en anguila está bien caracterizada por el estado del ovario, y que corresponde a los meses de invierno, es prácticamente inexistente en los peces con puestas continuas, ya que en estas especies, el ciclo ovárico es muy corto, y los ovarios presentan durante todo el año, varias poblaciones de oocitos en distintas etapas de desarrollo.

A la etapa de reposo le siguen las distintas etapas de **proliferación** y **maduración ovárica**. Estas etapas se suceden de forma rápida, en algunos casos en forma explosiva, alcanzando un IGS de 3.5. Esto significa que en un periodo de tiempo relativamente corto, el oocito aumenta 1000 veces su volumen. Nuevamente vemos una correlación directa entre la fisiología reproductiva de *S. marmoratus* y el hábitat en donde se desarrolla, ya que es probable que los procesos de maduración final y oviposición se sucedan rápidamente para poder utilizar las charcas temporarias en donde habita.

6.5. REVERSIÓN SEXUAL

La evidencia anatómica, histológica y experimental demuestran que la anguila criolla es una especie hermafrodita protogínica diándrica (Lo Nostro y Guerrero, 1996).

Entre los peces hermafroditas el origen y ubicación del tejido germinal masculino varía entre los distintos grupos. En los serránidos y en los gramístidos, estadios inmaduros de tejido testicular se encuentran presentes en regiones restringidas y aisladas del ovario (por ejemplo en el género *Serranus sp*), en forma restringida pero mezclada con tejido femenino (género *Rypticus sp*) o totalmente entremezclado con el tejido ovárico (género *Epinephelus sp*) (Smith, 1965). En los spáridos existe una zona masculina totalmente separada (Atz, 1964), mientras que en algunos lábridos porciones de tejido en etapas tempranas de espermatogénesis se encuentra presente dentro del ovario de las hembras (Robertson, 1972). En algunos géneros de gobiidos, el tejido espermatogénico preformado puede encontrarse presente tanto en forma aislada como difusa a lo largo del tejido ovárico, como es el caso de *Eviota sp* o confinado a una región testicular claramente identificable en una porción de la gónada, como en los géneros *Trimma sp* y *Priolepis sp* (Cole 1990, Robertson & Justines, 1982). En otros géneros de peces protoginicos, como por ejemplo *Lophogobius sp*, *Fusigobius sp* y *Lythrypnus sp*, el tejido masculino no es visible en el ovario hasta el momento del cambio de sexo (Cole, 1988, 1990).

En la anguila criolla el tejido espermatogénico parece no ser evidente en el ovario hasta el momento de cambio de sexo. Sin embargo, no es raro encontrar animales con ovarios bien desarrollados y activa vitelogénesis que presentan en la zona del epitelio germinal algún cisto de tejido espermático, típicamente con espermatoцитos I, II y ocasionalmente con espermátidas. A nivel morfológico y funcional estos ovarios no parecen en absoluto haber iniciado procesos de reversión sexual. El proceso de reversión ocurre normalmente en determinado momento de la ontogenia del animal y de acuerdo a la bibliografía existente (Chan & Phillips, 1967a, Chan & yeung, 1983) y a la evidencia

obtenida en el laboratorio, siempre se inicia pasado un periodo reproductivo. Es difícil creer que la gran cantidad de energía invertida en el proceso de vitelogénesis sea desechada en un momento aleatorio del ciclo gonadal anual. En la anguila criolla no existe evidencia sobre la presencia de intersexos bien establecidos fuera del periodo post-reproductivo o de reposo gonadal. Por este motivo es que estas ocasionales apariciones de tejido espermático en ovarios en desarrollo, no pueden ser consideradas como el inicio de la reversión sexual. Más bien debe interpretarse como la activación, en un grupo de células germinales totipotentes, de un programa de diferenciación gonadal en una especie que sufre naturalmente procesos de reversión sexual y que por motivos no establecidos, se encuentra fuera de “timing” y se diferencian en un tipo celular no acorde con el status sexual del momento.

Esta posición se basa en una de las hipótesis vigentes acerca del origen y función de las células germinales. Las células germinales femeninas y masculinas ya diferenciadas pueden estar presentes en una gónada simultáneamente y no ser distinguibles, por lo menos a nivel óptico (Cole & Shapiro, 1992, Flores & Burns, 1993). Otra hipótesis propone que las células germinales primordiales (CGP) colonizarían las gónadas durante la diferenciación sexual, pero se mantendrían en un estadio indiferenciado durante toda la vida del animal (Flores & Burns, 1993). Al iniciarse el periodo de proliferación germinal previo la época reproductiva, esta CGP se dividiría activamente por mitosis, dando origen a otra CGP, que permanecería totipotente y a una oogonia de tipo A (OOGa), que por nuevas mitosis originaría las oogonias B (OOGb) que formarían los nidos e iniciarían el proceso de meiosis, crecimiento y vitelogénesis (Reinboth, 1980). Ambas hipótesis no son excluyentes y pueden ajustarse a la realidad observada en la anguila criolla.

Estas hipótesis no son nuevas y ya fueron propuestas por Yamamoto en el año 1969. Este autor definió dos tipos de peces teleósteos de tipo gonocórico. Uno de tipo “indiferenciado”, en donde una gónada indiferenciada se desarrolla primero en una gónada con aspecto de ovario, y en forma posterior da origen a un ovario o a un

testículo bien diferenciado. En el segundo tipo de teleosteo, de tipo “diferenciado”, una gónada indiferenciada se desarrolla directamente en ovario o testículo. En este último grupo es muy difícil encontrar peces con reversión sexual y gónadas intersexuadas (Yamamoto, 1969).

Por último una tercera hipótesis, si bien no muy difundida, es la de Flores & Burns (1993) quienes proponen que las células de soporte (células de Sertoli o foliculares) estarían indiferenciadas y se desarrollarían en un sentido u otro, dependiendo del estímulo recibido. No existen hasta el momento evidencias experimentales que soporten esta hipótesis.

INDUCCIÓN HORMONAL DE LA MADURACIÓN FINAL DE GAMETAS

Capítulo 2

7. INTRODUCCIÓN

En vertebrados, la regulación de la actividad reproductiva está controlada por el sistema nervioso central (SNC). El cerebro, por ser su función la de integrar gran parte de las señales provenientes del exterior y del interior del organismo interviene en todos los pasos del ciclo reproductivo.

En los últimos diez años el avance de las investigaciones permitió precisar el grado y tipo de participación de los diferentes sistemas neuronales y áreas cerebrales implicados en el control de la liberación de hormonas relacionadas con el crecimiento, la maduración de las gónadas, y el comportamiento sexual (Van Weerd & Richter, 1991; Degani & Schreiber, 1993; Kah *et al.*, 1993; Kawauchi, 1994; Montero & Dufour, 1996).

Los peces representan una de las clases más numerosas de vertebrados y también es el grupo que presenta mayor variedad de estrategias sexuales (Blázquez *et al.*, 1998). Esta elevada diversidad, sin embargo, no permite realizar generalizaciones dado que los conocimientos obtenidos hasta el presente sólo son válidos para unas pocas especies dentro de las casi 20.000 que conforman la clase (Nelson, 1994).

En el control endócrino de la reproducción, las gonadotrofinas (GtHs), glicoproteínas sintetizadas y liberadas por la hipófisis, juegan un papel fundamental en el desarrollo y maduración de las gametas. Su secreción es controlada por un complejo sistema neuroendócrino llamado "eje hipotálamo-hipofisario-gonadal".

Es bien sabido que existen diferentes tipos de señales externas que al ser captadas por el SNC, estimulan la síntesis y liberación de un neuropéptido clave para la reproducción llamado "hormona liberadora de gonadotrofinas" (GnRH), conocida anteriormente como LHRH. Breton *et al.* (1971) fueron los primeros en demostrar, en peces, la acción de este neuropéptido sobre la liberación de gonadotrofinas hipofisarias mediante la administración de extractos hipotalámicos en cultivos de hipófisis de carpa (*Cyprinus carpio*). Estas primeras experiencias fueron seguidas por otras realizadas *in*

vivo en las cuales se obtuvieron niveles de GtHs en plasma significativamente superiores a los de los animales controles (Breton & Weil, 1973, Weil *et al.*, 1975).

En los teleósteos GnRH es transportada desde el hipotálamo por fibras nerviosas que inervan, en la hipófisis, directamente las células gonadotróficas estimulando la síntesis y secreción de gonadotrofinas. Estas son luego descargadas al torrente sanguíneo y su principal órgano blanco son las gónadas (Blázquez *et al.*, 1998).

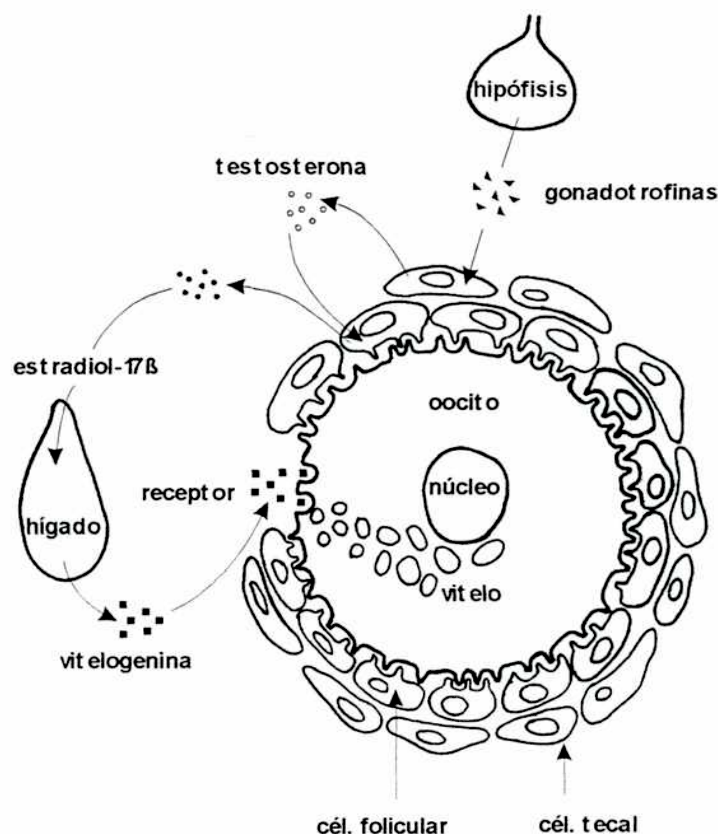
Los estudios llevados a cabo hasta el presente indican que al igual que en los demás vertebrados, la hipófisis de los peces secreta dos tipos distintos de gonadotrofinas, denominadas GtH-I y GtH-II, que se homologarían respectivamente a las FSH y LH de vertebrados tetrápodos (Quérat, 1994). Ambas gonadotrofinas son glicoproteínas formadas por una subunidad α y una subunidad β , siendo esta última la que le da la especificidad. En la trucha arcoiris, *Onchorhynchus mykiss*, las subunidades β de ambas gonadotrofinas, coinciden en su secuencia aminoacídica en un 31% (Swanson *et al.*, 1991). GtH-I y GtH-II presentan actividad esteroidogénica sobre diversos tipos celulares de las gónadas.

Los oocitos de los vertebrados no mamíferos, aumentan significativamente de tamaño mientras se encuentran arrestados en la primera profase meiótica. La causa principal responsable de este crecimiento es la incorporación de gran cantidad de sustancia de reserva de composición lipoproteica, denominada vitelo. Las gonadotrofinas inducen la producción de esteroides sexuales en el ovario (17 β estradiol principalmente) los cuales son vertidos al torrente sanguíneo y estimulan la síntesis y secreción hepática de vitelogenina. Esta última es posteriormente captada del plasma circulante e incorporada a los folículos en desarrollo (Wallace, 1985).

En general los niveles plasmáticos de GtH-I son elevados durante todo el periodo de vitelogénesis y descienden antes de la ovulación y deposición de los huevos. Por otro lado los niveles de GtH-II medidos en plasma se mantienen bajos durante toda la vitelogénesis y se incrementan abruptamente inmediatamente antes de la ovulación y la puesta (Blázquez *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 1986). Esta evidencia sugiere que GtH-

I induciría principalmente la síntesis gonadal de esteroides sexuales que llevan a cabo los procesos de vitelogénesis y desarrollo ovárico, mientras que GtH-II jugaría un rol muy importante en la dirección de los mecanismos de maduración final de las gametas, estimulando a los folículos ováricos a sintetizar un “factor inductor de la maduración “ (FIM) (Nagahama, 1994, Nagahama *et al.*, 1995). Aunque los mecanismos de captación de la vitelogenina hepática en sangre, por parte de las células que envuelven al folículo en crecimiento, continúan siendo estudiados, los receptores para vitelogeninas presentes en la membrana plasmática de los oocitos han sido aislados y caracterizados en varias especies (Chan *et al.*, 1991; Lancaster & Tyler, 1991; Le Menn & Nuñez Rodríguez, 1991). Además, experiencias *in vitro* han demostrado que la captura de vitelogenina por parte de folículos ováricos intactos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) es estimulada por efecto de GtH-I, pero no de GtH-II (Tyler, 1991).

La activa participación de las células tecales y foliculares en la síntesis de esteroides sexuales está muy bien documentada. Se ha propuesto un modelo en el cual intervienen dos tipos celulares en la síntesis folicular del 17 β estradiol. En este modelo las células tecales, bajo la influencia de las gonadotrofinas, secretan testosterona, que llega a las células foliculares en donde se localiza, en forma exclusiva, una enzima, la aromatasa que cataliza la formación de 17 β estradiol. (Nagahama, 1987, 1994, 1997).



- Modelo esquematizado de la regulación hormonal del crecimiento de los oocitos en peces teleosteos (adaptado de Nagahama, 1994)

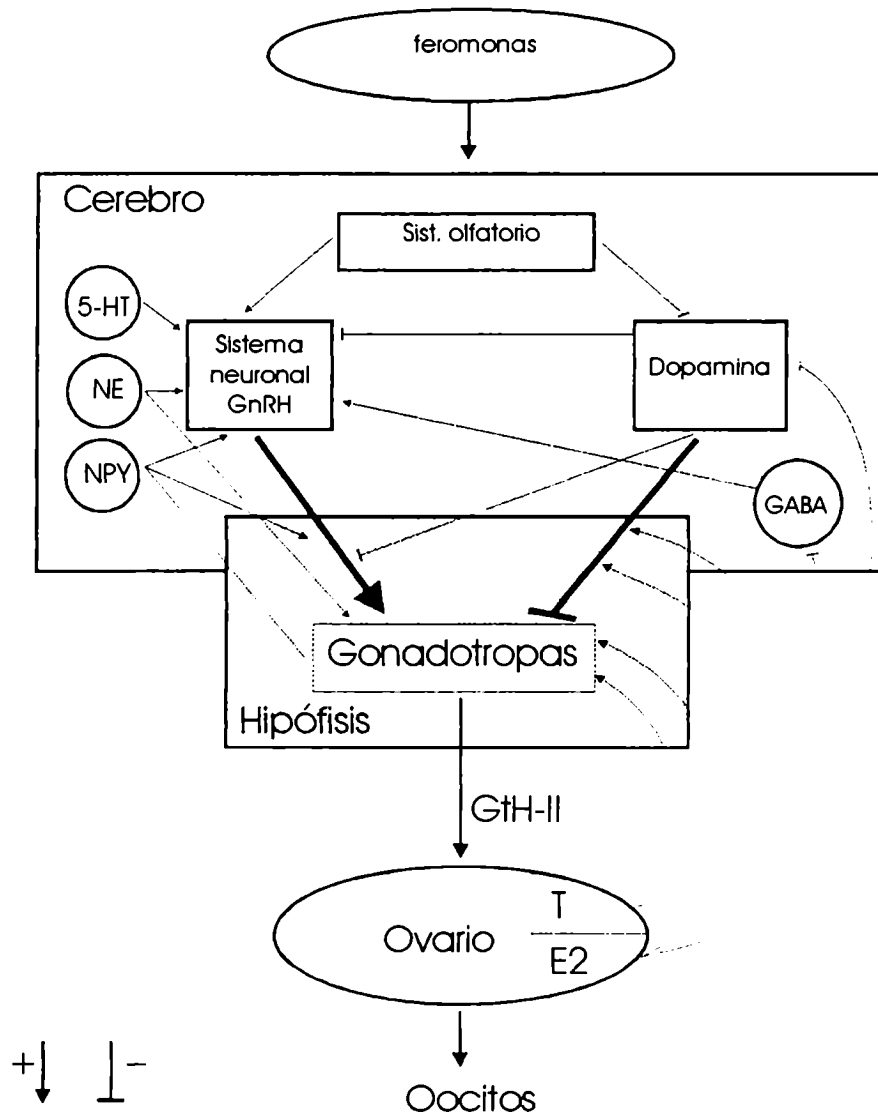
Sin embargo, este modelo parece no ser válido para algunas especies en las cuales no aparecen células teca especiales. En estos casos se ha verificado por medio de experiencias *in vitro* que las células foliculares (o de la granulosa) son el sitio de mayor síntesis de 17β estradiol, y que su producción no depende de las células teca (Onitake & Iwamatsu, 1986; Petrino *et al.*, 1989).

La capacidad que tienen los folículos intactos de producir 17β -estradiol en respuesta a la estimulación por gonadotrofinas, se incrementa durante el crecimiento del

oocito, pero decrece rápidamente durante la maduración oocitaria (Kagawa *et al.*, 1983).

Experimentos *in vitro* han demostrado que la producción de testosterona por parte de las células tecales, como respuesta a la estimulación con gonadotrofinas, se incrementa gradualmente durante el crecimiento del oocito, tiene un valor máximo durante el período post vitelogénico, y se mantiene durante la maduración y ovulación del folículo (Kanamori *et al.*, 1988). La actividad de la enzima aromatasa se incrementa en las células foliculares durante la vitelogénesis y decrece rápidamente durante la maduración del oocito. Esta caída en la actividad de la aromatasa parece coincidir con la disminución de la producción de 17β -estradiol por parte del folículo. Dado que la producción de testosterona en las células tecales, no se ve modificado durante todo este período, la disminución en los niveles de 17β -estradiol, estaría exclusivamente relacionada con la menor actividad de la aromatasa en las células foliculares. Inmediatamente antes de la maduración oocitaria, los folículos adquieren la capacidad de producir $17\alpha,20\beta$ -dihidroxiprogesterona ($17\alpha,20\beta$ -DP), en respuesta a la acción de las gonadotrofinas. Las células tecales no pueden producir $17\alpha,20\beta$ -DP hasta el momento de la maduración del oocito.

En el proceso reproductivo, todos los mecanismos de síntesis y secreción se encuentran íntimamente relacionados por una compleja red de controles, que actúan a modo de retroalimentación o "feed back" regulando el proceso. Existen diversos factores que intervienen en este sistema de control, tales como neurohormonas, neuropéptidos, catecolaminas, esteroides sexuales, etc. (Guiguen *et al.*, 1993; Trudeau *et al.*, 1991, 1993, Peter *et al.*, 1991, Peter y Yu, 1997).



- Modelo de regulación neuroendócrina de la secreción de GtH-II en hembras de goldfish. Las flechas indican acciones estimuladoras conocidas, las líneas con barras, indican acciones inhibitorias conocidas. E2: estradiol; GABA: ácido gama aminobutírico; GnRH: hormona liberadora de gonadotropina; NPY, neuropéptido Y; NE: norepinefrina; 5-HT: serotonina; T: testosteron. (Adaptado de Peter y Yu, 1997).

Utilizando técnicas de lesiones cerebrales controladas, Peter y Paulencu (1980), fueron los primeros en sugerir la presencia de un factor inhibitor de la liberación de GtH-II originado en la zona preóptica, que alcanzaba la hipófisis via la región anterior

ventral del hipotálamo. Este sistema de inhibición estaría dado, en algunos teleósteos, por la acción de un neurotransmisor, la dopamina, sobre la secreción y acción de GnRH tanto en cerebro como en hipófisis. La especificidad de la inhibición de GTH-II por efecto de la dopamina, ha sido bien estudiada en el goldfish (*Carassius auratus*) por medio de experiencias *in vivo* e *in vitro* (Peter *et al.*, 1986, 1991).

Kah *et al.* (1984) demostraron por medio de técnicas inmunocitoquímicas la presencia de un núcleo dopaminérgico en el area preóptica del encéfalo del goldfish, que se conecta directamente con la hipófisis por medio de fibras dopaminérgicas. Las células gonadotróficas en la hipófisis del goldfish, reciben innervación directa de las fibras dopaminérgicas, y se ha visto que ésta innervación se interrumpe experimentalmente al lesionar el área preóptica ventral anterior. Estos estudios proveyeron la base anatómica de la actividad inhibitoria de la dopamina sobre la liberación de GtH (Kah *et al.*, 1987).

En casi todas las especies de peces estudiadas, la dopamina ha demostrado tener un efecto inhibitor sobre la liberación de GtH-II (basal y/o estimulado por GnRH) por acción directa sobre las células gonadotróficas, así como sobre la liberación misma de GnRH (Peter *et al.*, 1986; Peter & Yu, 1997). Sin embargo la corvina Atlántica (*Micropogonias undulatus*), ha demostrado ser una excepción al control inhibitorio de la liberación de GtH-II por efecto de la dopamina, en contraposición al resto de los estudios llevados a cabo hasta el presente en teleósteos (Copeland & Thomas, 1989). La secreción de GtH-II en la hipófisis se encuentra estimulada por varios neurotransmisores cerebrales, aparte de GnRH, incluyendo al neuropéptido Y (NPY), al ácido γ -aminobutírico (GABA), la norepinefrina (NE), la serotonina (5-HT) y la colecistoquinina (CCK) (Peter *et al.*, 1991; Trudeau & Peter, 1995; Yu *et al.*, 1997).

Se ha visto en muchas especies que los antagonistas de los receptores dopaminérgicos (pimozide y domperidona) potencian el efecto inductor de GnRH sobre la liberación de GTH. El tratamiento combinado de un antagonista dopaminérgico, con un agonista de GnRH ha demostrado ser altamente eficiente en la inducción de la

ovulación en muchas especies de interés en acuicultura, incluyendo la carpa común, carpa herbívora, bagre africano, bagre chino, pacú, goldfish, etc. (Chang *et al.*, 1984; Peter *et al.*, 1986, 1987a; Lin *et al.*, 1988). Algunas experiencias llevadas a cabo en especies hermafroditas, ha provisto evidencia acerca de su posible acción sobre la reversión sexual en condiciones controladas (Kramer *et al.*, 1993; Tao *et al.*, 1993,).

Este tratamiento combinado se conoce como “método Limpe”(Peter *et al.*, 1988) y se comercializa con el nombre de “Ovaprim” (Syndel Laboratories, Canada). Esta técnica para inducir ovulación y espermiación en especies de cultivo posee una serie de ventajas sobre los métodos tradicionales de inducción. Entre otras puede nombrarse el reducido costo de las drogas sintéticas, la estabilidad de las drogas sometidas a largos periodos de almacenamiento, buena predicción del momento de la ovulación desde la inyección, alta fertilidad de las gametas obtenidas, alta tasa de supervivencia de los alevinos, bajo nivel de estrés en el lote de reproductores, debido a la necesidad de una única inyección, falta aparente de efectos colaterales sobre el sistema inmune, etc. (Peter *et al.*, 1988).

GnRH

Hasta el presente se han aislado y secuenciado doce formas de esta molécula en vertebrados y dos en protocordados (Sower *et al.*, 1993; Ngamvongchon *et al.*, 1992, Carolsfeld *et al.*, 2000; Powell *et al.* 1996; Jimenez-Liñan *et al.*, 1997; Powell *et al.*, 1994; Montaner *et al.*, inédito).(tabla A).

La primer variante de GnRH fué descrita en mamíferos, específicamente en cerdos y ovejas (Burgus *et al.*, 1972; Matsuo *et al.*, 1971) y nombrado como mGnRH. Desde entonces distintas variantes de GnRH fueron identificadas, aisladas y secuenciadas en distintas clases de vertebrados y en una clase de protocordados. Por convención las variantes de GnRH son nombradas de acuerdo a la primera especie en que son descritas. El patrón estructural de las formas de GnRH conocidas es muy característico.

Es un decapeptido con los residuos 1, 4, 9 y 10 conservados, el extremo amino terminal ciclado formando un piroglutamato (pGlu) y el extremo carboxiloterminal amidado (Gly-amida) (Tabla A).

TABLA A

TABLA A		↓	↓	↓	↓
Mamífero	(mGnRH)	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂			
Chicken I	(cGnRH-I)	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Gln- Pro-Gly-NH ₂			
Seabream	(sbGnRH)	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Ser-Pro-Gly-NH ₂			
Catfish	(cfGnRH)	pGlu-His-Trp-Ser- His-Gly-Leu-Asn-Pro-Gly-NH ₂			
Salmón	(sGnRH)	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Trp-Leu-Pro-Gly-NH ₂			
Dogfish	(dGnRH)	pGlu-His-Trp-Ser-His-Gly-Trp-Leu-Pro-Gly-NH ₂			
Chicken II	(cGnRH-II)	pGlu-His-Trp-Ser-His-Gly-Trp-Tyr-Pro-Gly-NH ₂			
Lamprea III	(lGnRH-III)	pGlu-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH ₂			
Lamprea I	(lGnRH-I)	pGlu-His-Tyr-Ser-Leu-Glu-Trp-Lys-Pro-Gly-NH ₂			
Guinea-pig	(gpGnRH)	pGlu-Tyr-Trp-Ser-Tyr-Gly-Val-Arg-Pro-Gly-NH ₂			
Arenque	(hGnRH)	pGlu-His-Trp-Ser-His-Gly-Leu-Ser- Pro-Gly-NH ₂			
Tunicado I	(tGnRH-I)	pGlu-His-Trp-Ser-Asp-Tyr-Phe-Lys-Pro-Gly-NH ₂			
Tunicado II	(tGnRH-II)	pGlu-His-Trp-Ser-Leu-Cys-His-Ala-Pro-Gly-NH ₂			
Pejerrey	(pGnRH)	PGlu-His-Trp-Ser-Phe-Gly-Leu-Ser- Pro-Gly-NH ₂			

En casi todas las especies de vertebrados estudiadas se ha verificado la coexistencia de dos variantes de GnRH en el sistema nervioso (Tabla B) (Sherwood *et al.*, 1997, King & Millar, 1985; 1992; Lepretre *et al.*, 1993; Somoza *et al.*, 1994). y en algunas especies de hasta tres formas distintas de GnRH (Powell, *et al.*, 1994, Stefano *et al.*, 1997; Montaner *et al.*, inédito) en el sistema nervioso. Diferentes experiencias han demostrado que las diferentes variantes de GnRH tendrían distinta función de acuerdo a su distribución neuroanatómica (Sherwood *et al.*, 1997).

TABLA B algunas especies de vertebrados con dos y tres variantes de GnRH

lamprea (<i>Petromyzon marinus</i>)	lGnRH-I y lGnRH-III
dogfish (<i>Squalus acanthias</i>)	dGnRH y cGnRH-II
salmón (<i>Oncorhynchus keta</i>)	sGnRH y cGnRH-II
catfish (<i>Clarias sp</i>)	cfGnRH y cGnRH-II
rana (<i>Rana ridibunda</i>)	mGnRH y cGnRH-II
cocodrilo (<i>Aligator mississippiensis</i>)	cGnRH-I y cGnRH-II
pollo (chicken) (<i>Gallus domesticus</i>)	cGnRH-I y cGnRH-II
Rata y humano	mGnRH y cGnRH-II
besugo (<i>Sparus aurata</i>)	sbGnRH, sGnRH y cGnRH-II
Pejerrey (<i>Odontesthes bonariensis</i>)	pGnRH, sGnRH y cGnRH-II

La función más conocida de GnRH es la de estimular la síntesis y liberación de gonadotrofinas en la hipófisis. Neuronas inmunorreactivas a mGnRH, cGnRH-I, sGnRH, cfGnRH o sbGnRH han sido localizadas en la zona preóptica de la parte basal del cerebro anterior y sus axones mostraron terminar en vasos del sistema porta hipotálamo-hipofisario en tetrápodos, o en la hipófisis de peces teleosteos. Esta evidencia indica que estas formas de GnRH estarían principalmente involucradas, en el control de la reproducción, con la síntesis y liberación de gonadotrofinas. En los peces teleosteos la forma de GnRH con actividad liberadora de gonadotrofinas es fácilmente identificable ya que las terminaciones nerviosas de las células productoras de GnRH, alcanzan directamente a las células gonadotróficas. En los peces con dos o tres formas de GnRH, también es común encontrar dos de ellas en hipófisis (Powell *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1995; Somoza *et al.*, 1994).

Además GnRH actúa, en algunas especies estimulando la liberación de otras hormonas hipofisarias: hormona de crecimiento (GH) (Marchant *et al.*, 1989, Mahmoud *et al.*, 1996), prolactina (Prl) (Weber *et al.*, 1997) y somatolactina (SL) (Kakisawa *et*

al., 1997. A modo de ejemplo Vissio *et al.* (1999) y Stefano *et al.* (1999) demostraron en el pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) inervación GnRHérgica en relación directa con células hipofisarias productoras de GtHs, GH, PRL y SL, y la presencia de receptores ("binding sites") para GnRH en la membrana de estas células.

Se ha visto también la expresión de GnRH y receptores de GnRH en diversos tejidos periféricos. Es hoy bien sabido que GnRH tiene funciones parácrinas y/o autócrinas en tejidos extrahipofisarios tanto relacionados con la reproducción (ovario y testículo) como no relacionados con la misma (hígado y riñón) (Chieffi *et al.*, 1991; Habibi & Matsoukas, 1999).

OBJETIVOS

El objetivo de esta parte del trabajo fué identificar las variantes moleculares de hormonas liberadoras de gonadotrofinas (GnRH) presentes en el cerebro e hipófisis de la anguila criolla *Synbranchus marmoratus*.

Esto permitiría a su vez conocer la relación entre ellas y la regulación y secreción de gonadotrofinas hipofisarias. Para ello se diseñaron experiencias de inducción hormonal utilizando un análogo superactivo de la sGnRH-A combinado con Domperidona como antagonista dopaminérgico.

8. MATERIALES Y METODOS

8.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS VARIANTES ENDÓGENAS DE GnRH:

8.1.1. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO NERVIOSO

Se extrajeron cerebros e hipófisis de 50 anguilas, que fueron inmediatamente congelados en hielo seco y mantenidos allí hasta su almacenamiento a -70°C en el laboratorio. En el caso de las hipófisis, se utilizaron, debido a la poca masa que éstas poseen, 100 glándulas en un solo ensayo a fin de hacer significativa y detectable la concentración de GnRH presente.

Tanto los cerebros como las hipófisis, fueron homogeneizados en acetona:HCl 1N (100:3 V/V). Estos homogenatos fueron mantenidos a 4°C durante 3 horas con agitación constante y filtrados con papel Whatman N° 1. El residuo insoluble fue reextraído en acetona:HCl 0,01N (80:20 V/V) y refiltrado. Los filtrados fueron combinados y tratados con éter de petróleo por cinco veces sucesivas. El extracto final se concentró hasta un volumen de 1 ml (Somoza *et al.*, 1994).

8.1.2. HPLC

El extracto fue filtrado mediante un filtro del tipo Millipore HA 0,45µm para su inyección en el HPLC. Se utilizó un loop de inyección de 1 ml y una Columna RP 18 Lichospher 100 (4x250 mm; 5 µm, Merck) de fase reversa. El gradiente de solventes utilizado fue el siguiente: una elución isocrática de 10 minutos en acetonitrilo al 17% en TEAF (ácido fórmico 0,25 M llevado a pH 6,5 con trietilamina). La concentración de acetonitrilo fue aumentada linealmente hasta un 24% en un periodo de 7 minutos y se

continuó isocráticamente por un total de 70 minutos. El flujo fue programado para 1 ml/min. La inyección del extracto cerebral fue precedida por una corrida blanco en la cual se inyectó fase móvil para descartar cualquier contaminación. La posición de elusión de los estándares sintéticos se determinó por absorción a 280 nm. Las muestras recolectadas fueron luego liofilizadas y resuspendidas en PBS-BSA 0,5%, pH 7,5.

8.1.3. RIA (RADIO INMUNO ENSAYO)

Se utilizaron 3 antisueros poliespecíficos elevados contra distintas variantes moleculares de GnRH. Los antisueros utilizados fueron: cII #678 (gentilmente cedido al Dr. Gustavo Somoza por la Dra. J. King, de la Universidad de Ciudad del Cabo) elevado contra cGnRH-II y utilizado en un sistema con mGnRH como estándar y como molécula marcada, PBL#45 (cedido al Dr. Gustavo Somoza por el Dr. W. Vale, de la Clayton Foundation) elevado contra cGnRH-I y utilizado en un sistema con sGnRH como estándar y como molécula marcada, PBL#49 (Dr. W. Vale) elevado contra sGnRH y utilizado en un sistema homólogo, con distintas reactividades cruzadas contra variantes conocidas de GnRH. (tabla C)

Tabla C: Porcentaje de reactividades cruzadas de los antisueros utilizados con las variantes de GnRH conocidas.

variante de GnRH	CII678	PBL 45	PBL 49
Dilución	1:32000	1:150000	1:250000
Sensibilidad	3.65 pg/100µl	2.36 pg/100µl	1.49 pg/100µl
GnRH radio-iodinado	mGnRH	sGnRH	sGnRH
GnRH standard	mGnRH	sGnRH	sGnRH
mGnRH	100%	100%	93%
cGnRH-I	416%	133.3%	333.3%
cGnRH-II	81%	25.9%	32.6%
sGnRH	473%	100%	100%
lGnRH-I	3%	24%	2%
lGnRH-III	nd	nd	nd
dfGnRH	18%	1.58	4.59
cfGnRH	36%	nd	nd
sbGnRH	nd	nd	Nd

nd: no se han determinado los valores de reactividad cruzada.

Se realizaron análisis por diluciones sucesivas de las fracciones con inmunoreactividad para cGnRH-II y sGnRH para confirmar la presencia de estas dos moléculas. Se utilizaron para tal fin tres antisueros monoespecíficos contra estas variantes, sGnRH#2 (cedido al Dr. Somoza por el Dr. K. Aida, the University of Tokio) y s1668 para sGnRH y cII665 para cGnRH-II (cedidos al Dr. Somoza por la Dra. J. King, de la Universidad de Ciudad del Cabo). Los porcentajes de reactividad cruzada con las variantes de GnRH conocidas se comparan en la tabla D.

Tabla D: Reactividades cruzadas de los antisueros monoespecíficos utilizados, con las variantes de GnRH conocidas.

Variantes de GnRH	CII665 (dil. Final 1:160000)	s1668 (dil. final 1:10000)	Aida sGnRH (dil. final 1:300000)
mGnRH	< 0.01%	< 0.01%	< 0.01%
cGnRH-I	< 0.01%	< 0.01%	< 0.01%
CGnRH-II	100%	0.7%	1.58%
sGnRH	3%	100%	100%
IGnRH-I	< 0.01%	0.4%	< 0.08%
LGnRH-III	nd	nd	nd
dfGnRH	nd	nd	398
cfGnRH	nd	nd	nd
sbGnRH	nd	nd	nd

nd: no se han determinado los valores de reactividad cruzada.

El grado de desplazamiento de las curvas respecto de las curvas obtenidas con las hormonas estándar fue comparado estadísticamente utilizando un test de ANOVA, modificado por el Dr. Enrique Marschoff del Lab. de Biometría de la FCEyN (UBA).

La inmunodetección con antisueros poliespecíficos en los mismos sistemas heterólogos se realizó también con los extractos hipofisarios para determinar qué variantes se encontraban presentes en la hipófisis de esta especie.

8.2. INDUCCIÓN DE LA MADURACIÓN FINAL Y OVULACIÓN

Durante los meses de Enero y Febrero de 1994, se realizaron una serie de experiencias de inducción de la maduración final y ovulación mediante la utilización de

sGnRH-A ([D-Arg⁶, Trp⁷, Leu⁸, Des-Gly¹⁰]-LHRH-Ethylamida, Peninsula laboratories) y domperidona (Farmacéutica Janssen, Buenos Aires). El objetivo de esta primera experiencia, fue poner a punto el sistema de mantenimiento de ejemplares en cautiverio, de extracción de sangre y de administración y respuesta a las drogas ensayadas. En base a estos primeros resultados y a bibliografía específica consultada (Tao *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993; Kramer *et al.*, 1993; Milomas *et al.*, 1992; Kreiberg *et al.*, 1987), se programó una nueva experiencia para el periodo Febrero-Marzo de 1995.

8.2.1. OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LOS EJEMPLARES

En la experiencia del año 1994, los animales fueron capturados en la localidad de Santo Tomé (prov. Santa Fe). En la experiencia del año 1995 se utilizaron animales provenientes de la provincia de Chaco comprados a un proveedor local.

Los animales una vez en el laboratorio, fueron pesados, medidos y acondicionados en piletas y contenedores con agua declorada, hasta su utilización.

Todos los animales fueron identificados utilizando marcas plásticas numeradas unidas con hilo de sutura a la región dorso caudal. Los grupos de anguilas se mantuvieron en cajas plásticas en un volumen de 50 litros de agua declorada (con recambios periódicos), fotoperiodo natural y temperatura ambiente (28°-30°C).

Al comenzar las experiencias los ejemplares fueron anestesiados con benzocaína disuelta en agua (0.1g/l) y se tomaron los parámetros ictiométricos de rutina. Finalizada las experiencias, los animales sobrevivientes, fueron sacrificados y procesados de acuerdo a la técnica descripta en el punto 4.2. del capítulo 1), con el objeto de estudiar el estado de maduración gonadal.

8.2.2. DESARROLLO DE LAS EXPERIENCIAS

i) **Periodo Enero - Febrero 1994:**

La experiencia tuvo una duración de 16 días.

Se conformaron cuatro lotes de animales, cada uno correspondiente a un tratamiento distinto. Cada lote estuvo constituido por 12 animales distribuidos en forma homogénea en cuanto a peso y talla. No se identificó el estatus sexual de los mismos.

Los lotes definidos fueron:

lote 1: Grupo control	(sc. salina / sc. salina)
lote 2: Grupo domperidona	(sc. salina / domperidona)
lote 3: Grupo GnRH	(sGnRH-a / sc. salina)
lote 4: Grupo GnRH-domperidona	(sGnRH-a / domperidona)

Las drogas fueron disueltas y suspendidas en solución salina para peces al 0.7% (peso en volumen) e inyectadas intramuscular en las siguientes concentraciones: domperidona 5µg/g , sGnRH-A 0.05µg/g (ambas drogas en 2µl/g de sc. salina como vehículo).

Los animales fueron diariamente controlados en todas las experiencias para verificar la liberación espontánea de gametas por medio de masaje abdominal (stripping).

A todos los animales se les extrajo aproximadamente 500 µl de sangre (muestra basal) de la arteria caudal, antes de la inyección (día 0) y a las 24 horas, 3, 6, 10 y 16 días, para medir los niveles de E2 y andrógenos circulantes. inmediatamente después de cada toma de sangre se sacrificaron dos ejemplares por lote, con el objeto de analizar la estructura gonadal. Las muestras de tejido gonadal fueron procesadas de acuerdo a lo expuesto en el capítulo 1.

ii) Periodo Febrero - Marzo 1995:

Durante los meses de Febrero y Marzo de 1995, se repitió la experiencia de inducción con una serie de modificaciones, según los resultados obtenidos durante el año 1994.

La experiencia tuvo una duración de 7 semanas (49 días).

Debido a la ausencia de dimorfismo sexual externo, se recurrió al sexado por medio de biopsia en posición ventrolateral, de acuerdo a lo expuesto en el capítulo 1. La técnica se llevó a cabo una semana antes del inicio de la experiencia, para asegurar una correcta cicatrización de la herida.

Se utilizaron hembras en estadios previtelogénicos, seleccionando solo aquellos animales cuyos ovarios presentaran oocitos mayores a 2-3mm, que corresponden a estadios de vitelogénesis media (ver escala de crecimiento oocitario en capítulo 1). Debido a estas "limitaciones" en la selección de los animales y pese a haber revisado un número importante de animales (n=70), el número de ejemplares por lote se vio significativamente disminuido, quedando 4 animales en el grupo control y 5 animales en el grupo tratado. Dado que los animales en cautiverio no se alimentaban correctamente, se les suministró una pasta hecha con hígado vacuno y carne de pescado, utilizando una sonda buco gástrica durante el periodo en que el animal estaba bajo el efecto del anestésico.

Los lotes definidos fueron:

lote 1: Grupo control	(sc. salina / sc. salina)
lote 2: Grupo tratado	(sGnRH-a / domperidona)

Las drogas fueron disueltas y suspendidas en solución salina para peces al 0.7% e inyectadas intramuscularmente en las siguientes concentraciones:

lote 1: 4µl/g sc. salina para peces.

lote 2: 0.1 µg/g sGnRH-a (en 2µl/g de sc. salina como vehículo) y 5µg/g domperidona (en 2µl/g de vehículo).

Los lotes fueron inyectados los días 1 y 4 de cada semana. Se les extrajo 1 ml de sangre en forma previa a la primera inyección (muestra basal) y a las 24 horas de la 2^{da} inyección de la 3^o y 7^o semana (días 19 y 47). Todos los animales fueron diariamente controlados por masaje abdominal para verificar la liberación espontánea de gametas.

8.3. DOSAJE DE ESTEROIDES SEXUALES EN SANGRE

8.3.1. EXTRACCIÓN DE SANGRE Y OBTENCIÓN DE SUEROS

Las muestras de sangre de aproximadamente 500µl y 1ml por animal (1994 y 1995 respectivamente), se extrajeron por punción post-anal de la vena caudal utilizando jeringas de tuberculina. La sangre se mantuvo a 4°C hasta la retracción del coágulo (aprox. 24 hs) y se extrajo el suero por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Este último se almacenó a -20°C hasta su utilización

8.3.2. EXTRACCIÓN DE LOS ESTEROIDES SEXUALES Y RIA

Una vez obtenido el suero, se extrajeron los esteroides con éter etílico. La fase orgánica obtenida fue evaporada a 37°C en baño termostático, y con atmósfera de Nitrógeno. Las muestras secas fueron resuspendidas en buffer fosfato con gelatina 0.1% (PBSgel) (cuatro veces el volumen de la muestra original), y conservadas a -20°C hasta su uso. Se utilizaron antisueros anti-estradiol y anti-testosterona, provistos por el Dr.

Gordon Niswender (Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Dept. of Physiology, Colorado State University, USA) en concentraciones finales de 1:120.000 y 1:250.000 respectivamente. La reactividad del antisuero anti-testosterona, contra 11-cetotestosterona (11-KT) fue de un 37% (Somoza, datos no publicados). En vista de la alta reactividad cruzada con 11-KT, y a la imposibilidad de diferenciarla de la T presente, los valores de hormona medidos se expresan como "niveles de andrógenos".

Se realizaron diluciones seriales del suero extraído y se lo comparó con una curva estándar de T, para chequear el grado de paralelismo de las curvas.

Los niveles de esteroides sexuales obtenidos fueron testeados estadísticamente con un test de Student, comparando el grupo control versus el tratado en la tercera y séptima semana. La significancia de la prueba se realizó con un $p < 0.05$.

Todas las experiencias fueron llevadas a cabo en forma conjunta con la Lic. Fabiana Lo Nostro, del Laboratorio de Embriología Animal, quien desarrolló el mismo protocolo de trabajo con grupos de machos.

9. RESULTADOS

9.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS VARIANTES ENDÓGENAS DE GnRH

Con los tres sistemas ensayados se detectaron en cerebro dos picos principales, coincidentes con la posición de elusión de cGnRH-II (fracciones #25-#27) y sGnRH (fracción #46-48) (figura 33).

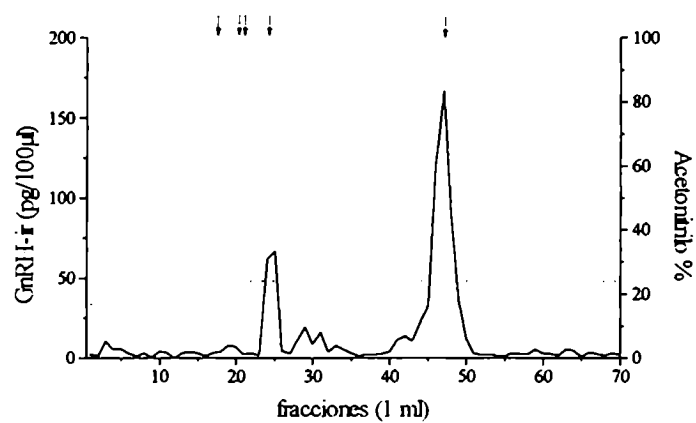
Por otra parte con estos mismos tres sistemas se coincidió en la detección de un pico de inmunoreactividad menor, en la fracción #29 que no eluye en la posición de elusión de ninguna de las variantes sintéticas de GnRH ensayadas (cfGnRH, lGnRH-I, mGnRH, cGnRH-I, cGnRH-II y sGnRH). Este pico fue inmunodetectado usando los tres sistemas de RIA, pero no tuvo reacción cruzada en el sistema ensayado con cll675, ni con dos sistemas específicos para sGnRH (datos no expuestos).

Las pruebas de inmunodetección llevadas a cabo mediante la dilución de las fracciones de los dos picos principales en estudio y de estándares conocidos utilizando los antiseros específicos correspondientes, reforzaron la hipótesis de la presencia de esas variantes. La curva obtenida por la dilución de estas muestras no mostró diferencias significativas con los estándares sintéticos (figura 34).

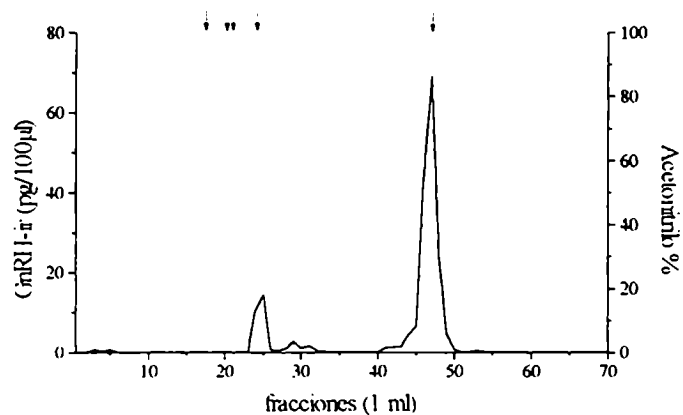
Los extractos de tejido hipofisario analizados con la misma metodología, no muestran ningún tipo de inmunoractividad a GnRH.

Figura 33: HPLC de fase reversa en extractos cerebrales de *S. marmoratus* ensayados con: a) antisuero cII678, b) antisuero PBL#49, c) antisuero PBL#45. Las flechas muestran la posición de elución. De izquierda a derecha cI GnRH, mGnRH y LI GnRH, cII GnRH; sGnRH.

a) cII678



b) PBL#49



c) PBL#45

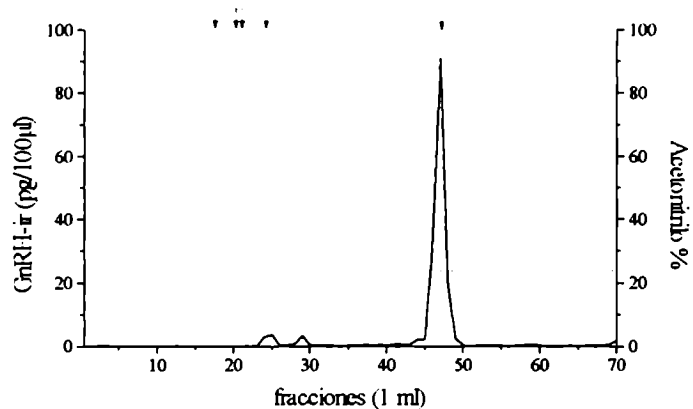
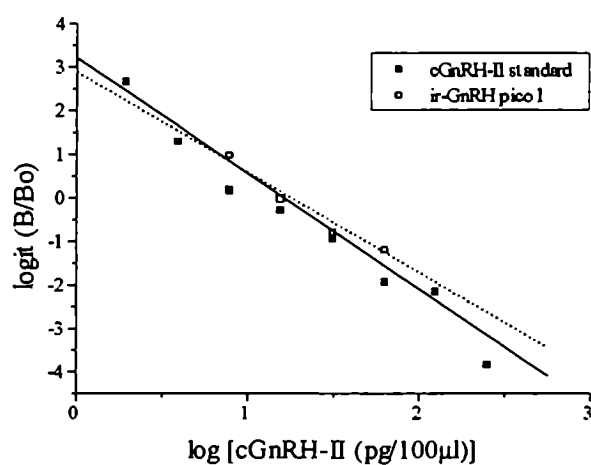
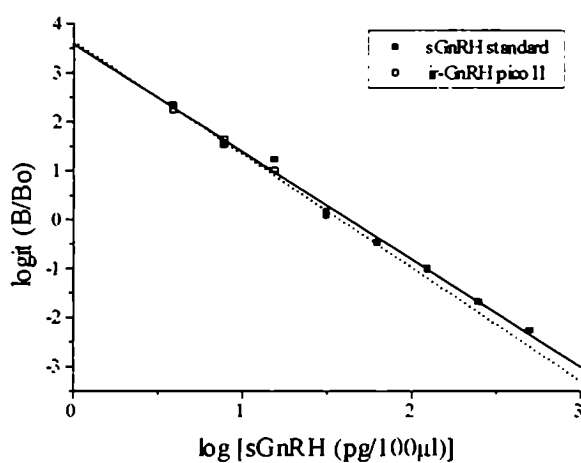


Figura 34: Paralelismo de diluciones seriales de diversas fracciones de extractos hipofisarios de HPLC con respecto a variantes sintéticas utilizando diversos antisueros. a) fracciones 24-25 con respecto a cII GnRH, utilizando antisuero cII675. b) fracciones 45-49 con respecto a sGnRH utilizando antisuero s1668. c) fracciones 45-49 con respecto a sGnRH utilizando antisuero sGnRH Aida.

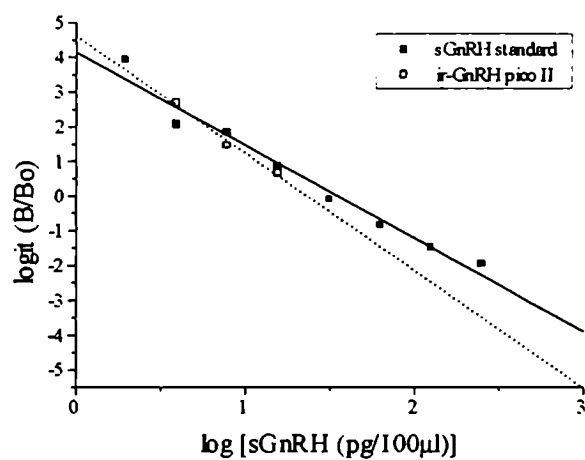
a) cIIIGnRH y antisuero cII678



b) sGnRH y antisuero s1668



c) sGnRH y antisuero sGnRH#2



9.2. INDUCCIÓN DE LA MADURACIÓN FINAL DE GAMETAS

La experiencia de inducción desarrollada durante el verano del año 1994, provocó en sólo una hembra y un macho del grupo tratado con sGnRH y domperidona, la liberación de gametas al 6º día de iniciado el tratamiento por masaje abdominal.

El tratamiento utilizado durante la experiencia del verano del año '95, no provocó en las hembras tratadas, la liberación de gametas en forma espontánea o por masaje abdominal.

9.3. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LAS GÓNADAS DE LOS ANIMALES TRATADOS

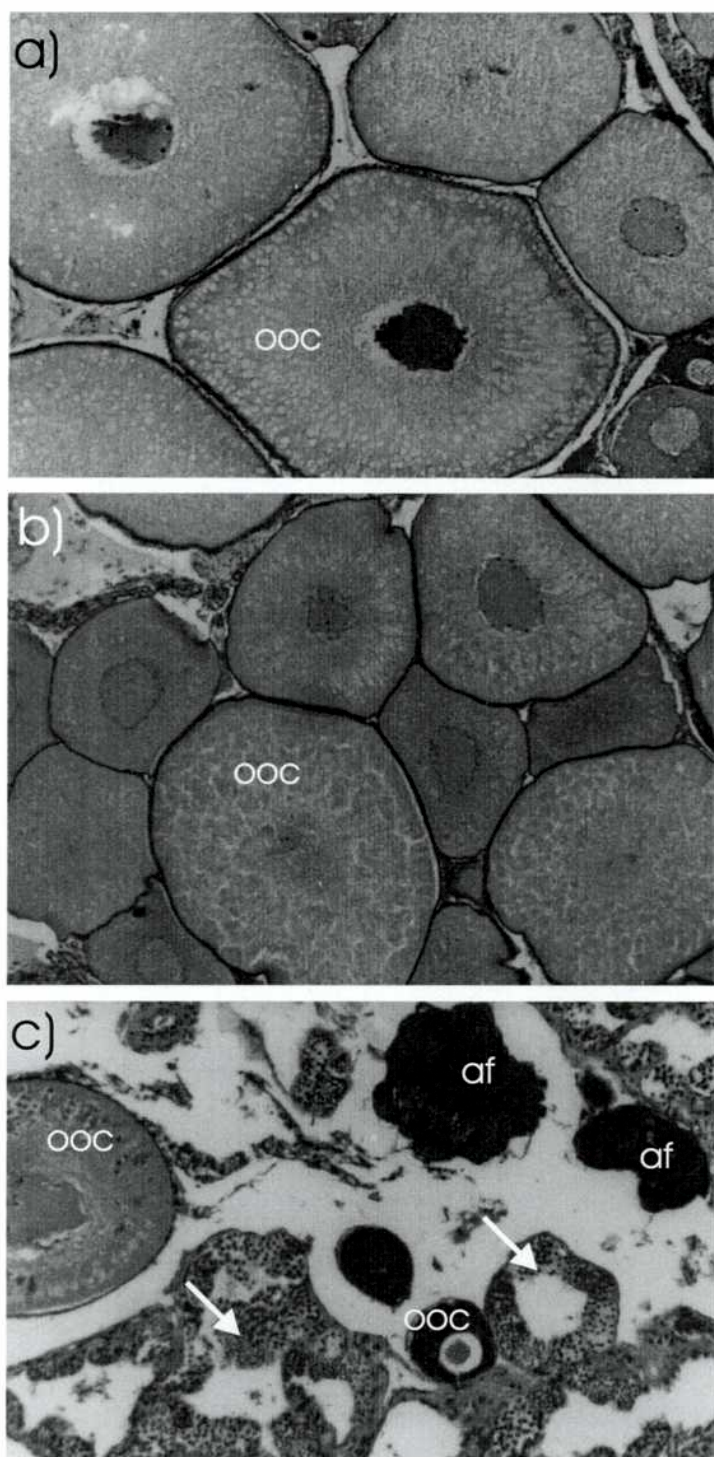
El análisis de las gónadas de los animales tratados durante la experiencia del año 94, no mostró variaciones (en ambos sexos), entre los distintos lotes de animales.

Por otro lado, el análisis histológico de los ovarios de anguilas tratadas durante la experiencia del año 95, muestra que el 100% de los animales tratados se encuentra en distintas etapas de reversión sexual, observándose diversos tipos de gónadas intersexuadas, desde estadios iniciales, hasta estadios casi finales en donde se observan células de toda la serie espermática.

Es importante destacar que ninguno de los dos grupos de hembras (control y tratado) mostraron signos de ovulación. El análisis histológico de las gónadas de las hembras del grupo control al final de la experiencia mostró la presencia de oocitos en estadios medios de vitelogénesis (figura 35b), similar al observado por medio de biopsia antes de iniciar la experiencia (figura 35a). Por otro lado las gónadas de los animales tratados con GnRH y Domperidona, mostraron fuertes evidencias de reversión sexual. Las gónadas mostraron un pequeño número de oocitos, muchos de ellos en estado de

atresia y gran cantidad de tejido testicular en desarrollo, con lóbulos espermáticos en organización y varios elementos de la serie espermática (figura 35c). Tras siete semanas de tratamiento, las gónadas se encontraron en estadios finales de reversión sexual.

Figura 35: Detalle histológico de las gónadas de animales utilizados en la experiencia de inducción de la maduración final. a) Corte de ovario de los animales del grupo control biopsados antes del inicio de la experiencia (x100). b) Corte de ovario de un animal del grupo control al final de la experiencia (x100). c) Corte histológico de la gónada de un animal del grupo tratado con GnRH y domperidona. Se observa el grado avanzado de reversión sexual. El tejido espermático se encuentra en desarrollo, mientras que el tejido femenino, se encuentra en clara regresión (x100). af: atresia folicular; ooc: oocito; flecha: lóbulo espermático con elementos de la serie espermática dentro de cistos.



9.4. DOSAJE DE ESTEROIDES SEXUALES

Para verificar la acción de tratamiento con GnRH se dosaron esteroides sexuales presentes en sangre, con la idea de evaluar indirectamente la liberación de gonadotrofinas hipofisarias, ya que no disponíamos de un sistema directo de medición de estas últimas hormonas. La curva de diluciones seriales del extracto de suero fue paralela a la curva estándar de T (datos no presentados).

Los niveles de E2 y de andrógenos medidos en los animales de la experiencia del año 94, fueron muy heterogéneos, presentando desvíos estándar muy elevados (en algunos casos iguales al 60% de la media) (datos no presentados). Estas grandes variaciones sin embargo, no enmascararon el hecho de que en el grupo tratado con sGnRH-a + domperidona, se pudieran observar a las 24hs de la administración de las drogas, niveles de andrógenos varias veces superiores a los de los otros tratamientos.

Los niveles de andrógenos medidos en el grupo tratado con sGnRH-A + domperidona durante el año 95, fueron en todos los casos significativamente mayores a los del grupo control (figura 36, tabla E). En ningún caso pudieron detectarse niveles de E₂ con el sistema utilizado. La dosis mínima detectable de estradiol fue de aproximadamente 20pg/ml, y la de andrógenos 15pg/ml.

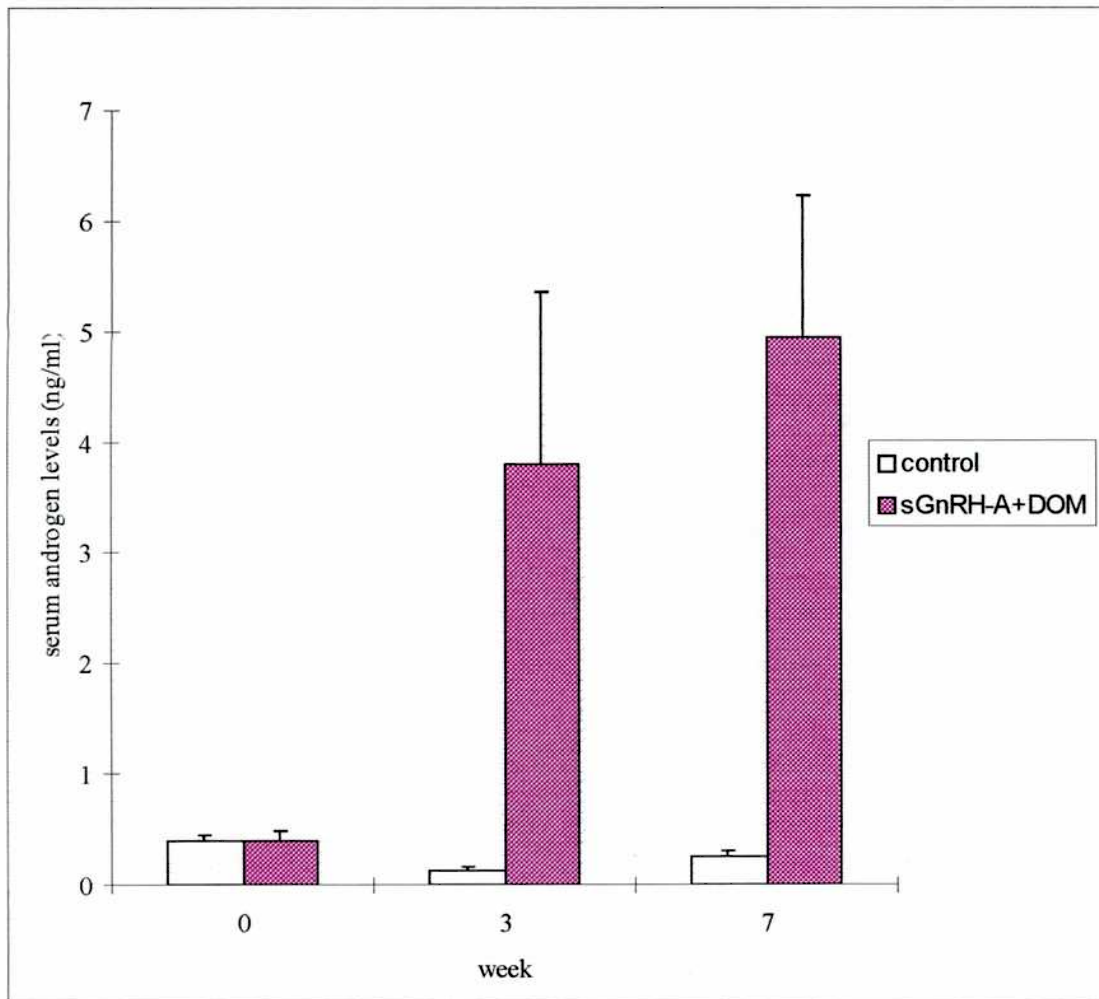


Figura 38: Niveles de andrógenos séricos (ng ml^{-1}) en el grupo de hembras al inicio de la experiencia, a las 3 y 7 semanas de tratamiento. Las barras representan la media $\pm$ el desvío estandar. (grupo control n:4, grupo tratado n:5). ** $p < 0.01$ comparado a los niveles control.

TABLA E: niveles de E2 y andrógenos dosados en sangre.

GRUPO CONTROL (solución salina + solución salina)

<i>DIA 0</i>		<i>DIA 19</i>		<i>DIA 47</i>	
<i>E2</i>	<i>andrógenos</i>	<i>E2</i>	<i>andrógenos</i>	<i>E2</i>	<i>andrógenos</i>
nd	0,258	nd	0,078	nd	0,344
nd	0,513	nd	0,204	nd	0,324
nd	0,379	nd	0,083	nd	0,127
nd	0,399	nd	nd	nd	0,176
nd	0,387 +/- 0,052	nd	0,121 +/- 0,041	nd	0,242 +/- 0,054

NOTA: Todos los valores están expresados en pg/ml

GRUPO TRATADO (GnRH + domperidona)

<i>DIA 0</i>		<i>DIA 19</i>		<i>DIA 47</i>	
<i>E2</i>	<i>andrógenos</i>	<i>E2</i>	<i>andrógenos</i>	<i>E2</i>	<i>andrógenos</i>
nd	0,665	nd	2,340	nd	3.182
nd	0,196	nd	***	nd	6.337
nd	0,535	nd	8,469	nd	6.747
nd	0,395	nd	1,528	nd	0.828
nd	0,177	nd	2,928	nd	7.672
nd	0,393 +/- 0,095	nd	3,79 +/- 1,56	nd	4.95+/- 1.28

NOTA: Todos los valores están expresados en pg/ml.

***: dato faltante

10. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos al analizar los extractos de tejido nervioso, utilizando una combinación de HPLC de fase reversa y RIA, sugieren que *Synbranchus marmoratus* tiene en su cerebro al menos dos variantes diferentes de GnRH en el cerebro: cGnRH-II y sGnRH.

La caracterización de las fracciones obtenidas por HPLC con 3 sistemas distintos de RIA mostraron, en todos los casos dos picos con inmunorreactividad a GnRH que coeluyeron con las formas sintéticas de cGnRH-II y sGnRH. El paralelismo de las diluciones seriales de las fracciones inmunoreactivas de cGnRH-II y sGnRH comparado con curvas preparadas con péptidos homólogos sintéticos no mostró diferencias significativas. En estos casos se utilizaron antisueros específicos (cl1675 para cGnRH-II; y sGnRH#2 y sl668 para sGnRH). Estos datos refuerzan los resultados obtenidos por HPLC de fase reversa.

Además, se detectó un pequeño pico con inmunoreactividad a GnRH, eluyendo entre las dos formas antes mencionadas. Sin embargo con los datos disponibles no nos es posible determinar el significado de este resultado. Este pico podría representar productos de degradación o precursores de alguna de las formas presentes, que, a pesar de las alteraciones sufridas respecto a la molécula original, aún pueden ser reconocidas por el antisuero. También es posible suponer que se trata de una forma distinta a las conocidas y a las reconocidas por los antisueros utilizados.

Por su posición de elusión podría corresponder a pGnRH descrita recientemente en el pejerrey por Montaner *et al.* (inédito). Esto apoyaría la evidencia más reciente que señala que en general los peces teleósteos presentan tres formas diferentes de GnRH en el cerebro, siendo una de ellas la que tiene actividad

gonadotrófica en hipófisis (Carolsfeld *et al.*, 2000; Gothilf *et al.*, 1996; Okuzawa *et al.*, 1996; Stefano *et al.*, 1997; White *et al.*, 1995). Respecto a la primera hipótesis es poco probable que tres antisueros poli específicos distintos y con distintas reactividades cruzadas, inmunodetecten este pico en posiciones tan definidas y constantes como se presentan en los sistemas realizados. Por otro lado, para poder determinar la naturaleza de esta localización, sería necesario llevar a cabo una serie de pruebas de especificidad con una batería de antisueros más numerosa, seguidas de un aislamiento y secuenciación del compuesto con el fin de determinar su estructura molecular.

En *Synbranchus marmoratus*, al igual que en todos los teleósteos, la parte anterior de la hipófisis está directamente inervada por fibras hipotalámicas (Peter *et al.*, 1991; Vissio *et al.*, 1996). La valoración de la inmunoreactividad a GnRH en fracciones de extracto hipofisario obtenidas por HPLC de fase reversa, se llevó a cabo para determinar qué forma de GnRH llega a la hipófisis de esta especie, sugiriendo de esta manera una actividad regulatoria sobre las hormonas hipofisarias. El hecho de no detectarse inmunoreactividad pudo deberse entre otras cosas a que la concentración de los péptidos presentes en esta glándula es normalmente baja (el péptido solo se encuentra en terminaciones nerviosas), al bajo número de glándulas utilizadas en el experimento y/o a que las hipófisis utilizadas provenían en su mayoría de animales en estadios de regresión gonadal. Al respecto es bien sabido que las concentraciones de GnRH varían con el estadio de maduración sexual en peces (Amano *et al.*, 1992; Dufour *et al.*, 1993; Okuzawa *et al.*, 1990). Sería necesario entonces analizar un número de glándulas mucho mayor y provenientes de animales en estadios pre-reproductivos o reproductivos.

En peces óseos en general se ha visto que cGnRH-II es la forma más conspicua. Además de esta variante, algunas especies pueden tener mGnRH (King *et al.*, 1990;

Sherwood *et al.*, 1991) sGnRH (Sherwood *et al.*, 1984; Yu *et al.*, 1988) cfGnRH (Bogerd *et al.*, 1992; Ngamvonchon *et al.*, 1992), sbGnRH (Powell *et al.*, 1994, 1996), hrGnRH (Carolsfeld *et al.*, 2000) o pGnRH (Montaner *et al.*, inédito).

La localización de cGnRH-II es predominante en áreas cerebrales extrahipotalámicas, mientras que la otra variante presente está localizada en el hipotálamo y la hipófisis (King *et al.*, 1990; Dufour *et al.*, 1993; Ngamvonchon *et al.*, 1992; Okuzawa *et al.*, 1990). En algunos casos cGnRH-II ha sido también detectada en la hipófisis (Yu *et al.*, 1988).

Un importante número de estudios utilizando métodos inmunocitoquímicos y caracterización de aminoácidos y cDNA documentan la coexistencia de múltiples formas de GnRH en el cerebro. Sin embargo se sabe muy poco acerca de su función. La localización de los péptidos suele utilizarse como indicador de su posible función. Por ejemplo, la cercanía a la hipófisis de neuronas productoras de GnRH implicarían un rol primario como liberador de gonadotrofinas; su detección en la parte anterior del cerebro, cerca de nervio olfatorio, y/o de proyecciones retinales, indicarían una relación en la integración de la información olfatoria y/o visual relacionada con el comportamiento reproductivo; la presencia de neuronas GnRHérgicas en el cerebro medio, podría estar asociada a un rol neuromodulador de conductas motoras asociadas a conductas reproductivas. Sin embargo todas estas hipótesis son especulativas y deben ser confirmadas con técnicas más específicas (por ejemplo “knockout” celular o génico) (Sherwood *et al.*, 1997).

Asumiendo que en el cerebro de la anguila criolla se co-expresan dos variantes de GnRH, podríamos asumir que al menos sGnRH se encuentra presente en las fibras hipotalámicas que terminan en la hipófisis, de acuerdo a la información reportada para peces teleosteos (King & Millar, 1995). Sumado a esto, la actividad gonadotrófica de las variantes de GnRH ha sido bien documentada y testada en peces óseos en general (King y Millar, 1995; Ngamvonchon *et al.*, 1992) y ha sido demostrado que tanto sGnRH como cGnRH-II tienen actividad biológica en la hipófisis (Sherwood *et al.*,

1997). Este fenómeno se debe sin duda alguna a la gran similitud estructural que existe entre todas las formas de GnRH.

Lamentablemente la mayoría de los antisueros utilizados en inmunohistoquímica, presentan reacción cruzada con más de una forma de GnRH, haciendo dificultoso conocer inequívocamente la variante presente en un determinado tipo celular (Habibi *et al.*, 1992; Zohar *et al.*, 1995).

La experiencia de inducción de la maduración final realizada durante el año '94, permitió detectar una serie de errores, así como tener en cuenta y mejorar una gran cantidad de factores con relación directa en los resultados obtenidos. El desarrollo sexual de los animales al inicio de la experiencia, la alimentación, las dosis de drogas administradas por peso vivo, la duración de la experiencia, el número de extracciones y el volumen de sangre extraído a cada animal, etc. Todos estos factores fueron contemplados en el diseño de la experiencia desarrollada durante el año '95. Respecto a los resultados obtenidos al final de la experiencia, podemos suponer que las dosis de sGnRH y/o de domperidona inyectadas, así como en la duración de la experiencia, no fueron suficientes para generar un cambio importante y detectable.

Es importante sin embargo hacer referencia a la hembra y el macho del grupo tratado con sGnRH-a + domperidona que emitieron gametas. Es muy probable que ambos animales tuvieran las gónadas en estadios muy avanzados de desarrollo, o incluso ya totalmente maduros, y que el estímulo de la inducción sirviera para desencadenar la ovulación y la eyaculación de las gametas

El nuevo protocolo de trabajo del año '95, demostró que en las hembras de *S. marmoratus*, el tratamiento con sGnRH-A + DOM por 7 semanas no indujo ovulación pero sí reversión sexual. En *S. marmoratus* la progresión de los estadios de transición sexual se dan básicamente de acuerdo al siguiente esquema: 1) estadios iniciales, caracterizados por la presencia de oocitos en diferentes estadios de crecimiento y

algunos cistos con espermatocitos; 2) estadios intermedios, mostrando el estroma gonadal en reorganización, con lóbulos espermáticos y cistos conteniendo diferentes elementos de la serie espermatogénica, aunque casi sin espermatozoides y con algunos oocitos dispersos; 3) estadios finales, caracterizados por poseer un tejido espermático bien organizado, con espermatocitos secundarios, espermátidas y en algunos casos espermatozoides. Ocasionalmente pueden observarse oocitos en estadios de atresia y degradación celular (Liem 1968; Lo Nostro y Guerrero 1996).

Dado que no se disponía de un sistema de valoración de los niveles de gonadotrofinas (GtHs) circulantes, se evaluaron los efectos del tratamiento con sGnRH +DOM midiendo los niveles séricos de dos esteroides gonadales: estradiol (E_2) y testosterona (T). Está bien documentado en peces óseos, que algunos andrógenos se encuentran en concentraciones elevadas tanto en machos como en hembras (Borg, 1994). Las concentraciones de 11-cetotestosterona (11KT) en teleósteos, son generalmente más altas en machos que en hembras (*Oncorhynchus mykiss*, Simpson & Wright, 1977; *Carassius auratus*, Rosenblum, *et al.*, 1985; *Oncorhynchus kisutch*, Leatherland *et al.*, 1982). Sin embargo las hembras de muchas especies no solo tienen 11KT en sangre, sino que los niveles detectados exceden los niveles de los machos (*Salmo salar*, Stuart-Kregor *et al.*, 1981). Más aún, al igual que en machos, los niveles plasmáticos de 11KT se incrementan durante la maduración ovárica en la trucha marrón (*Salmo trutta*) (Kime & Manning, 1982). Los niveles plasmáticos de T no muestran las mismas diferencias entre sexos que los encontrados para 11KT. Las hembras suelen mostrar marcados incrementos en sus niveles plasmáticos de T durante el periodo reproductivo, y a pesar de que en algunas especies los niveles de T de los machos son superiores (*Carassius auratus*, Rosenblum, *et al.*, 1985) en la gran mayoría de los peces, los niveles plasmáticos en hembras son similares e incluso mayores que aquellos de los machos (*Dicentrarchus labrax*, Prat *et al.*, 1990; *Catostomus commersoni*, Scott *et al.*, 1984; *Onchorynchus kisutch*, FitzPatrick *et al.*, 1986). Un dato interesante, es que 11KT no ha sido detectado en muchas especies de teleósteos hermafroditas. Sin

embargo, es importante aclarar que estas especies no formarían una unidad sistemática y que ninguna tendencia filogenética ha sido elaborada al respecto (Borg, 1994).

A pesar de que los niveles de andrógenos se incrementaron significativamente en comparación con los de los animales controles, los niveles de E_2 fueron inesperadamente no detectables en algunas de las mediciones efectuadas en las hembras del grupo tratado. Esto podría deberse al hecho de que los ovarios de estos animales no estuvieran liberando cantidades importantes de E_2 en el momento en que fue realizado el experimento y/o que los niveles presentes fueran menores a la dosis mínima detectable por el sistema utilizado (20pg/ml). Para el caso de los andrógenos, si bien los valores detectados fueron mucho mayores, el número de mediciones fue menor debido principalmente a la gran mortandad de animales en el inicio de la experiencia.

La gran diferencia entre los valores de esteroides medidos en los distintos animales de cada lote, podría corresponder evidentemente a la distinta respuesta hormonal dependiente del estado de madurez de los animales. Sin embargo, pese al bajo número de datos y a la gran heterogeneidad de los mismos se observa claramente para ambas hormonas que a las 24 horas de inyección los valores aumentaron significativamente respecto a los niveles basales, mostrando una disminución gradual a las 72 horas, que se acentuó con el transcurso del tiempo hasta ubicarse en niveles muy bajos, cercanos en algunos casos al límite de detección. Por otro lado, los lotes tratados con GnRH y GnRH/domperidona, muestran claramente perfiles esteroideos mucho más elevados que el lote tratado con domperidona, y el lote control, indicando que GnRH y domperidona estimulan de forma más efectiva la liberación de gonadotrofinas.

Los resultados obtenidos muestran claramente que el crecimiento oocitario se detiene, y se dispara el proceso de reversión sexual. El protocolo experimental utilizado no nos permite evaluar si es sGnRH y/o DOM quien/es inducen reversión sexual. En *M.*

albus ha sido demostrado que sGnRH-A es responsable de la reversión sexual (Tao *et al.*, 1993), a pesar de que Yeung *et al.* (1993) informaron que tratamientos prolongados con mGnRH-A (acetato de [D-Ala⁶, Des gly¹⁰] GnRH-etilamina) fue inefectivo como inductor de la misma. El mecanismo exacto por el cual sGnRH-A dispara la reversión sexual, es todavía poco conocido. Se sabe que GnRH estimula la liberación de GtHs endógenas, que a su vez pueden disparar la reversión sexual por si mismas, ya sea induciendo la liberación de esteroides sexuales en las gónadas o por medio de una acción directa sobre las gónadas. Apoyando esta hipótesis, se han descrito receptores de GnRH en ovarios de varias especies de teleósteos (Pati y Habibi, 1993). Por otro lado en otro pez protogínico, *Thalasoma bifasciatum* (Perciformes), el tratamiento con sGnRH combinado con DOM indujo reversión sexual total (Kramer *et al.*, 1993). Reinboth y Brusle-Sicard (1997) y Koulis y Kramer (1989) en otros teleosteos hermafroditas obtuvieron, administrando hCG en dosis variables, claros signos de reversión sexual, en diversas épocas del año. Kramer e Imbriano (1997), obtuvieron reversión gonadal en *Thalassoma bifasciatum* mediante la administración de neuropéptido Y (NPY). Este neuropéptido, como fuera demostrado en otras especies, potenciaría la secreción y liberación de GnRH y de GtH-II actuando directamente sobre la hipófisis (Breton *et al.*, 1989; Kah *et al.*, 1989).

A pesar de que se ha demostrado en varias especies que los esteroides sexuales pueden ocasionar reversión sexual precoz en condiciones experimentales (Chang *et al.*, 1984; Pandian y Sheela, 1995) diferentes dosis de andrógenos ensayados (metiltestosterona, testosterona y 11-KT) no fueron capaces de ocasionar reversión sexual incipiente en *M albus* (Tang *et al.*, 1974).

Aunque no existen, según nuestro conocimiento, referencias sobre la base fisiológica de la reversión sexual natural en *S. marmoratus*, los datos obtenidos en *Monopterus albus*, sugieren que la reversión sexual ocurriría posteriormente a una oviposición (Chan y Phillips, 1967a). Este periodo intersexuado dura aproximadamente 3-4 meses y finaliza con un testículo bien desarrollado y funcional (Tao *et al.*, 1993).

Estudios llevados a cabo en esta última especie, mostraron que la administración de hormona luteinizante ovina (oLH) indujo reversión sexual parcial en hembras postpuesta, pero no en hembras en estadios prepuesta (Tang *et al.*, 1974; Yeung *et al.*, 1993). Sin embargo el tratamiento con repetidas inyecciones de homogenato de hipófisis de carpa no promovió la reversión sexual sino que estimuló el desarrollo ovárico en esta especie (Tao *et al.*, 1993).

Este es un fenómeno muy interesante, ya que la misma hormona (GtH) que controla la liberación de los esteroides sexuales en el folículo ovárico, con el consiguiente desarrollo y maduración de los oocitos, parece desencadenar, bajo determinadas condiciones, reversión sexual completa.

Nuestras observaciones fortalecen entonces la hipótesis de Chan *et al.* (1975), Tang *et al.* (1974) y Chan y Yeung (1983) quienes proponen que la hormona gonadotrófica (GtH) tiene un rol clave en el proceso de reversión sexual en especies hermafroditas, y de esta manera involucrando directamente a GnRH como la hormona liberadora de dichas gonadotrofinas que actuarían sobre el ovario. Sin embargo la cadena de eventos y condiciones necesarias que hacen que una hembra, cambie totalmente su estructura gonadal a la de un macho funcional es, en condiciones naturales, todavía desconocida.

Es importante volver a señalar que durante el verano del año '94, la experiencia de inducción hormonal llevada a cabo produjo, en un único ejemplar recién traído de la naturaleza, ovulación y posterior liberación de oocitos (por masaje abdominal). Este resultado es una fuerte evidencia de que en animales recién capturados, con ovarios maduros y sin signos de estrés, el tratamiento con GnRH + domperidona, puede producir maduración final, ovulación y liberación de oocitos. Por otro lado el mismo tratamiento aplicado a un grupo de machos en las mismas condiciones ocasionó que uno de los animales liberase esperma por masaje abdominal (Lo Nostro *et al.*, 1996).

Sobre la base de toda la evidencia aquí expuesta, podemos sugerir que el efecto de la administración de hormonas de liberación de gonadotrofinas variaría de acuerdo al

estado reproductivo de los animales. El efecto de GnRH solo, GtHs y/o de los esteroides sexuales sobre la reversión sexual está siendo investigado actualmente.

11. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos, analizados y revisados a lo largo del presente trabajo nos permiten arribar a las siguientes conclusiones a modo de síntesis:

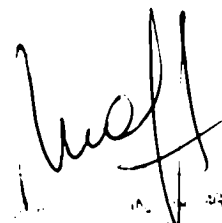
- *Synbranchus marmoratus* es una especie de hábitos cavícolas, adaptada a vivir en ambientes muy heterogéneos en lo que a variaciones ambientales respecta. Esta condición oportunista de aprovechar charcas temporarias, su alta resistencia a diversas condiciones en lo referente a calidad de agua y su capacidad de respirar oxígeno atmosférico, son condiciones que probablemente han favorecido su amplia distribución geográfica y condicionado su biología reproductiva.
- El ovario de *S. marmoratus*. Es una estructura impar que no difiere de lo descrito para otras especies de teleósteos. Muestra una actividad cíclica anual con un largo periodo de reposo y un periodo vitelogénico y maduracional corto.
- El periodo reproductivo de los ejemplares de esta especie muestra variaciones amplias en relación tanto a su distribución geográfica como así también entre ejemplares de una misma latitud, esta última debido a las distintas condiciones ecológicas donde se desarrollan los ejemplares. En

general podemos decir que en Argentina, *S. marmoratus* se reproduce entre octubre y marzo, siendo los meses del invierno periodos de reposo gonadal.

- El oocito maduro de *S. marmoratus* presenta al igual que la mayoría de los peces una envoltura vitelina cariácea con un único punto de entrada del espermatozoide: el micropilo. Parece existir un sistema de guía de los espermatozoides hacia el micrópilo, constituido por ornamentaciones características sobre la superficie externa del casquete animal de la envoltura vitelina. Esta característica es compartida por otras especies de peces teleósteos tales como *Sygnathus scovelli*.
- El análisis histológico de las gónadas de *S. marmoratus* como así también de distintos tejidos y órganos, ha permitido describir unas estructuras particulares conocidas como “centros melanomacrofágicos”. El estudio de los mismos permite concluir que tienen activa participación en relación con el sistema inmune de la anguila, y que su función no se está restringida en la gónada, al proceso de atresia oocitaria.
- Las 2 variantes moleculares de GnRH encontradas en el cerebro de la especie en estudio coinciden con las formas más comunes presentes en los peces teleósteos. Sin embargo, a la luz de hallazgos recientes, queda abierta la posibilidad que una tercera variante se encuentre representada en el cerebro de esta especie. Sería posible suponer entonces que esta tercer forma fuera la que tiene actividad reproductiva en hipófisis. Nuevos análisis empleando metodologías muy precisas de biología molecular, podrán resolver este punto.

- Nuestros estudios han puesto de manifiesto que el tratamiento hormonal utilizado con la intención de producir maduración final y ovulación, indujo reversión sexual completa en hembras de *S. marmoratus*. Estos resultados concuerdan con los de otros autores, y todos, indican que directa o indirectamente es GtH la hormona responsable de disparar los mecanismos de reversión sexual en algunas especies de peces teleósteos. Nuestros resultados muestran claramente que los niveles de respuesta a tratamientos hormonales, son muy cercanos entre los que disparan el mecanismo de reversión sexual y los que provocan maduración final y ovulación, y que este interjuego hormonal estaría fuertemente condicionado por factores bióticos y abióticos. Una vieja pregunta queda todavía sin responder: ¿cuál es el o los factores que transforman una célula germinal sexualmente bipotente en una oogonia o en una espermatogonia?. En el caso de *S. marmoratus* podemos agregar una nueva pregunta: ¿Cuál es la ventaja adaptativa del cambio de sexo? ¿Cuáles son las ventajas que adquiere *S. marmoratus* con dicho cambio?. Puede suponerse, y aún asegurarse, que a lo largo del proceso evolutivo, la aparición y adquisición del hermafroditismo por parte de una especie, ha sido beneficioso en la perpetuación de la especie. Esto es un hecho. Es posible que este tipo de plasticidad sexual sea una clara ventaja para una especie que habita ambientes típicamente temporales, que suelen quedar aislados de los cuerpos de agua principales en muy poco tiempo. Existe la probabilidad de que unos pocos ejemplares queden en estos cuerpos de agua, y gracias a la reversión sexual, puedan comenzar el desarrollo de una nueva población. El ser humano trata siempre de encontrar explicación para todos los fenómenos y procesos naturales, sin embargo, la gran mayoría no la tiene.

- Finalmente, *Synbranchus marmoratus* representa, a pesar de las dificultades predichas en lo que respecta a la captura y mantenimiento, un excelente modelo experimental para estudios básicos de biología reproductiva. En modo particular resulta fascinante analizar y comprender cómo las distintas condiciones ambientales regulan y condicionan los procesos de diferenciación sexual y la actividad reproductiva en esta especie.



MARIO ALDO FAVAGLIA
Lic. en Ciencias Biológicas



MARIO ALDO FAVAGLIA
Lic. en Ciencias Biológicas

13. BIBLIOGRAFIA

- AGIUS C. (1979). The role of Melano-Macrophages Centres in iron storage in normal and diseased fish. *J. Fish Diseases* 2, 337-343.
- AGIUS C. (1980). Phylogenetic development of melano-macrophage centres in fish. *J. Fish Diseases* 2:337-343.
- AGIUS C. (1985). The melano-macrophage centres in fish: A review. In: *Fish Immunology* (Manning M.J. & Tatner M.F. eds.) Academic Press, London, pp 85-105.
- AGIUS C. & S.A. AGBEDE. (1984). An electron microscopical study on the genesis of lipofuchsin, melanin and haemosiderinin haemopoietic tissue of fish. *J. Fish Biol.* 24, 471-488.
- AGIUS C. & R.J. ROBERTS. (1981). Effects of starvation on the Melano-Macrophage Centres of fish. *J. Fish Biol* 19, 161-169.
- AGOSTINHO S.S.; M. BARBIERI; G. BARBIERI y C. AGOSTINHO. (1987). Biologia reprodutiva de *Rhinelepis aspera* (Agassiz, 1829) (Teleostei: Loricariidae) no rio Paranapanema. II. Estrutura dos ovarios e estadio de maturacao. *Rev. Bras. Biol.* 47(3): 319-328.
- ALDANA, H.J.; C. FERRARI; I. BENITEZ & J. AFFANNI. (1996). Standarization of fixation, processing and staining methods for the central nervous system of vertebrates. *Biocell* 20(3): 265-272.
- AMANO, M.; K. AIDA; N. OKUMOTO & Y. HASEGAWA. (1992). Changes in salmon GnRH and chicken GnRH-II contents in the brain and pituitary, and GtH contents in the pituitary in female Masu salmon, *Oncorhynchus masou*, from hatching through ovulation. *Zool. Sci.* 9: 375-386.
- AMIRI, B.M.; M. MAEBAYASHI; A. HARA; S. ADACHI & K. YAMAUCHI. (1996). Ovarian development and serum sex steroid and vitellogenin profiles in the female cultured sturgeon hybrid, the bester. *J. Fish Biol.* 48: 1164-1178.
- ARDAVIN C.F. & A. ZAPATA. (1987). Ultrastructure and changes during metamorphosis of the lympho-hemopoietic tissue of the larval anadromous sea lamprey *Petromyzon marinus*. *Dev. Comp. Immunol.* 11: 79-93.

- ATKINSON R.J. & A.C. TAYLOR. (1991). Burrows and burrowing behavior of fish. In The Environmental Impact of Burrowing Animals and Animal Burrows. Proc. Symp. Zool. Soc. Lond. (Meadows P. & A. Meadows eds.). Zool. Soc. London, Clarendon Press, Oxford. N° 63: 133-155.
- ATZ J.W. (1964). Intersexuality in fishes. p 145-232. In : Intersexuality in vertebrates including man. C.N. Armstrong and A. Marshall (eds.). Academic Press, London, England.
- BANCROFT J.D. & A. STEVENS. (1990). Theory and Practice of Histological Technics. J. Bancroft and A. Stevens eds. 3rd. Edition. Churchill Livingstone. New York.
- BEGOVAC, P & R. WALLACE. (1987). Ovary of the Pipefish, *Syngnathus scovelli*. J. Morphol 193:117-133.
- BEGOVAC, P & R. WALLACE. (1988). Stages of oocyte development in the pipefish *Syngnathus scovelly*. J. Morphol. 197: 353-369.
- BESSEAU, L. & E. FALIEUX,. (1994). Resorption of unemitted gametes in *Lithognathus mormyrus* (Sparidae, Teleostei): a possible synergic action of somatic and immune cells. Cell Tissue Res. 276: 123-132.
- BILLARD, R. (1990). Spermatogenesis in teleost fish. En Marshall's Physiology of Reproduction (G.E. Lamming ed.) vol 2. Churchill Livingstone, Edimburgh. pp. 870-888.
- BLAZQUEZ, M., P.T. BOSMA, E.J. FRASER, K.J.W. VAN LOOK & V.L. TRUDEAU. (1998). Fish as models for the neuroendocrine regulation of reproduction and growth. Comp.Biochem. and Physiol. Part C 119: 345-364.
- BLOOM, W. Y D.W. FAWCETT. (1975). A textbook of histology. Philadelphia: W.B. Saunders Company. p.859-871.
- BOGERD, J.; T. ZANDBERGEN; E. ANDERSON & H. GOOS (1992). Isolation, characterization and expression of cDNA encoding the catfish-type and chicken-II-type gonadotropin-releasing hormone precursors in the african catfish. Eur. J. Biochem. 222: 541-549.
- BORG, B. (1994). Androgens in teleost fishes. Mini review. Comp. biochem. Physiol. vol. 109C, N°3: 219-245.
- BRETON, B. & C. WEIL. (1973). Effects du LH/FSH-RH synthétique et détraits hypothalamiques de carpe sur la secretion d'hormone gonadotrope *in vivo* chez la carpe (*Cyprinus carpio* L.). C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D 277: 2061-2064.

- BRETON, B.; B. JALABERT; R. BILLARD & C. WEIL. (1971). Stimulation *in vitro* de la liberation d'hormone gonadotrope hypophysaire par un facteur hypothalamique chez la carpe (*Cyprinus carpio* L.). C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D 273: 2591-2594.
- BRETON, B., M. GOVOROUN & T. MIKOŁOJCZYK. (1998). GtH-I and GtH-II secretion profiles during the reproductive cycle in female rainbow trout: relationship with pituitary responsiveness to GnRH-A stimulation. Gen Comp. Endocrinol. 111:38-50.
- BRETON, B., T. MIKOŁAJCZYK, J.M. DANGER, F. GONNET, S. SAINT-PIERRE & H. VAUDRY (1989). Neuropeptide Y (NPY) modulates *in vitro* gonadotropin release from rainbow trout pituitary glands. Fish Physiol. Biochem., 7: 77-83.
- BROWN C.L. & GEORGE C.J. (1985). Age dependent accumulation of macrophage aggregates in the yellow perch, *Perca flavescens* (Mitchill). J. Fish Diseases 8, 135-138.
- BRUSLE, S. (1985). Fine structure of oocytes and their envelopes in *Chelon labrosus* and *Liza aurata* (Teleostei, Migilidae). Zool. Sci. 2: 681-693.
- BURGUS, R., M. BUTCHER, M. AMOSS, N. LING, M. MONAHAN, J. RIVIER, R. FELLOWS, R. BLACKWELL, W. VALE & R. GUILLEMIN. (1972). Primary structure of ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF). Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 69: 278-282.
- CAROLSFELD, J.; J.F.F. POWELL; M. PARK; W.H. FISCHER; A.G. CRAIG; J.P. CHANG; J.E. RIVIER & N.M. SHERWOOD. (2000). Primary structure and function of three GnRH, including a novel form from an ancient teleost, herring. Endocrinol. In press.
- CASADEVALL, M.; S. BONET & J. MATALLANAS. (1993). Description of different stages in *Ophiodon barbatum* (Pisces, Ophiidae). Environ. Biol. Fishes. 36: 127-133.
- CASTELLO, H.P. (1973). La anguila criolla de agua dulce sudamericana. Revista Vida Acuática, 4:475-477.
- CHAN, S.T. (1977). Spontaneous sex reversal in fishes. En "Handbook of sexology" (J. Money and H. Musaph, eds.) pp 91-105. Elsevier/ North Holland Biomedical Press. Amsterdam.
- CHAN S.T. & J.G. PHILLIPS. (1967a). The structure of the gonads during natural sex reversal in *Monopterus albus* (Pisces, Teleostei). J. Zool. Lond. 151, 129-141.
- CHAN S.T. & J.G. PHILLIPS. (1967b). Seasonal changes in the distribution of gonadal lipids and spermatogenic tissue in the male phase of *Monopterus albus* (Pisces: Teleostei). J. Zool. Lond. 152: 31-41.

- CHAN S.T., O. WAI-SUM & S.W. B (1975). the gonadal and adenohipophysial functions of natural sex reversal. In *Intersexuality in Animal Kingdom* (Reihboth R. ed.), pp.201-221. Berlin: Springer Verlag.
- CHAN, S.T.; O. WAI-SUM; F. TANG & B. LOFTS. (1972). Biopsy studies on the natural sex-reversal in *Monopterus albus* (Pisces: Teleostei). *J. Zool. Lond.* 167: 415-421.
- CHAN, S.T.; C.H. TAN; K.M PANGM & T.J. LAM. (1991). Vitellogenin purification and development of assay for vitellogenin receptor in oocyte membranes of the tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1766). *J. Exp. Zool.* 257: 96-109.
- CHAN S.T., A. WRIGHT & J.G. PHILLIPS. (1967). The atretic structures in the gonads of the rice-field eel (*Monopterus albus*) during natural sex-reversal. *J. Zool. Lond.* 153, 527-539.
- CHAN S.T. & N. YEUNG. (1983). Sex control and sex reversal in fishes under natural conditions. In *Fish Physiology* (Hoar W., Randall D. & Donaldson E. eds.) vol IX - part B. pp 171-222. Academic Press. New York.
- CHANG, C.F.; M.F. LEE & G.R. CHENG. (1994). Estradiol-17 β associated with sex reversal in protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *J. Exp. Zool.* 268:53-58.
- CHANG, J.P.; R.E. PETER; C.S. NAHORNIAK & M. SOKOLOWSKA. (1984). Effects of catecholaminergic agonists and antagonists on serum gonadotropin concentrations and ovulation in goldfish: Evidence for especificity of dopamine inhibition fo gonadotropin secretion. *Gen. Comp. Endocrinol.* 55: 351-360.
- CHIEFFI, G., R. PIERANTONI & S. FASANO. (1991). Immunoreactive GnRH in hypothalamic and extrahypothalamic areas. *Int. Rev. Cyto.* 127: 1-55.
- COLE, K.S. (1988). Predicting the potential for sex-change on the basis of the ovarian structure, in gobiid fishes. *Copeia* 1988:1082-1086.
- COLE, K.S. (1990). Patterns of gonad structure in hermaphroditic gobies (Teleostei: Gobiidae). *Env. Biol. Fish.* 28: 125-142.
- COLE, K.S. & D.Y. SHAPIRO, (1992). Gonadal structure and population characteristics of the protogynous goby *Coryphopterus glaucofraenum*. *Marine Biol.* 113: 1-9.
- COPELAND, P.A. & P. THOMAS. (1989). Control of gonadotropin-release in Atlantic croaker: evide3nce for a lack of dopaminergic inhibition. *Gen. Comp. Endocrinol.* 74: 474-483.
- CRIM, L.W.; B.D. GLEBE & A.P. SCOTT. (1986). The influence of LHRH analog on oocyte development and spawning in female atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 56: 139-149.

- CUSSAC, V.E. & M.C. MAGGESE. (1986). Oogenesis in *Rhamdia sapo* (Pisces: Pimelodidae). Stages of the oocyte, egg's envelopes and effects of the human chorionic gonadotropin. Rev. Bras. Biol. 46(1): 139-147.
- DAS, B.K. (1946). Further observations on the ecology, bionomics and early development of the semi-terrestrial symbranchoid eel, Amphipnous cuchia (Ham. Buch.)- the Cuchia eel of India. Proc. Indian Sci. Congr. 33 (3):127 (Abstract).
- DEGANI G. & M.P. SCHREIBMAN. (1993). Pheromone of male blue gourami and its effects on vitellogenesis, steroidogenesis and gonadotropin cells in pituitary of the female. J. Fish Biol. 43: 475-485.
- DUFOUR, S.; M. MONTERO; N. LE BELLE; M. BASSOMPIERRE; J.A. KING; R.P. MILLAR; R.E. PETER & Y.A. FONTAINE. (1993). Differential distribution and response to experimental sexual maturation of two forms of brain gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the European eel, *Anguilla anguilla*. Fish Physiol. Biochem. 11: 99-106.
- DUMONT, J.E. & A.R. BRUMMET. (1980). The vitelline envelope, chorion and micropyle of *Fundulus heteroclitus* eggs. Gamete Res. 3: 25-44.
- DUMONT, J.E. & A.R. BRUMMET. (1985). Egg envelopes in vertebrates. In Developmental Biology: A Comprehensive Synthesis, (Browder L. De.) Vol. 1. New York: Plenum. pp 235-288.
- DONALDSON, E.M. & G.A. HUNTER. (1983). Induced final maturation, ovulation and spermiation in cultured fish. In: Fish Physiology (Hoar, W.S.; Randall, D.J. y Donaldson, E.M., eds.) vol 9 B, Academic Press : 351-403
- ELLIS A.E., A.L. MUNRO & R.J. ROBERTS. (1976). Defense mechanisms in fish. I A study of the phagocytic system and the fate of intraperitoneally injected particulate material in plaice (*Pleuronectes platessa*). J. Fish Biol. 8, 67-78.
- FAUSTO A.M.; E. GUANDALINI; A. MANTOVANI & M. MASSINI. (1993). Fine structure of egg shells of silverside *Odonthestes bonariensis* (Cuv. & Val.) (Teleostei: Atheriniidae). Anim. Biol. 2: 165-173.
- FERGUSON H.W. (1989). Systemic Pathology of Fish. Iowa State University Press/Ames. Iowa. USA. pp. 263.
- FITZPATRICK, M.S.; G. van der KRAAK & C. SCHRECK. (1986). Profiles of plasma sex steroids and gonadotropins in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, during final maturation. Gen Comp. Endocr. 62: 437-451.
- FLORES J. A. & J.R. BURNS. (1993). Ultrastructural study of embryonic and early adult germ cells, and their support cells, in both sexes of *Xiphophorus* (Teleostei: Poeciliidae). Cell Tissue Res. 271: 263-270.

- FOYLE T.P. (1993). A histological description of gonadal development and sex differentiation in the coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) for both untreated and oestradiol immersed fry. J. Fish Biol. 42: 699-712.
- GRAHAM, J.T. (1981). Burrowing and amphibious life of the swamp eel *Synbranchus marmoratus*. Am Zool. 21: 995.
- GRAHAM, J.T. (1994). An evolutionary perspective for bimodal respiration: A biological Synthesis of Fish Air Breathing. Amer. Zool. 34:229-237.
- GRAHAM, J.; T. BAIRD & W. STOCKMANN. (1987). The transition of air breathing in fishes. IV. Impact of branchial specializations for air breathing on the aquatic respiratory mechanisms and ventilatory costs of the swamp eel *Synbranchus marmoratus*. J. Exp. Biol. 129: 83-106.
- GOTHILF Y.; J.A. MUÑOZ CUETO; C. SAGRILLO; M. SELMANOFF; T. CHEN; O. KAH; A. ELIZUR & Y. ZOHAR. (1996). Three forms of gonadotropin-releasing hormone in perciform fish (*Sparus aurata*): Complementary deoxyribonucleic acid characterization and brain localization. Biol. Reprod. 55: 636-645.
- GOVOROU, M., J. CHYB & B. BRETON. (1998). Immunological cross-reactivity between rainbow trout GtH-I and GtH-II and their α and β subunits: application to the development of specific Radioimmunoassays. Gen Comp. Endocrinol. 111:28-37.
- GRIER H.G. (1981). Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. Amer. Zool. 21: 345-431.
- GRIER H.G. (1999). The ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). J. Morphol. 1999. In Press.
- GUIGUEN Y; B. JALABERT & A. FOSTIER. (1993). Changes in plasma and gonadal steroid hormones in relation to the reproductive cycle and sex inversion process in the protandrous seabass, *Lates calcarifer*. Gen. Comp. Endocrinol. 92: 327-338.
- GURAYA, S.S. (1978). Maturation of the follicular wall of nonmammalian vertebrates. In "The Vertebrate Ovary" (R.E. Jones, ed.), pp. 261-329. Plenum, New York.
- HABIBI, H.R. & J.M. MATSOUKAS. (1999). Gonadotropin Releasing Hormone: Structural and functional diversity. In Bioactive Peptides in Drug Discovery and Design: Medical Aspects. (J. Matsoukas & T. Mavromoustakos eds.) IOS Press. pp: 247-254.
- HABIBI, H.R., R. PETER, C. NAHORNIAK, R. MILTON & R. MILLAR. (1992). Activity of vertebrate gonadotropin-releasing hormones and analogs variant amino acid residues in positions 5, 7, 8 in the goldfish pituitary. Regul. Pep.37: 271-284.

- HABIBI, H.R., D. PATI, M. OUWENS & H. GOOS. (1994). Presence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) bindings sites and compounds with GnRH-like activity in the ovary of African catfish, *Clarias gariepinus*. Biol. Reprod. 50: 643-652.
- HAMAGUCHI, S. (1993). Alterations in the morphology of nuages in spermatogonia of the fish, *Oryzias latipes*, treated with puromycin and actinomycin D. Reprod. Nutr. Dev. 33:137-141.
- HERRAEZ M.O. & A.G. ZAPATA. (1986). Structure and function of the Melano-Macrophage Centers of the goldfish, *Carassius auratus*. Veter. Immunol. Immunopathol. 12, 117-126.
- HERRAEZ M.O. & A.G. ZAPATA. (1991). Structural characterization of melano-macrophage centres (MMC) of goldfish *Carassius auratus*. Eur. J. Morphol. 29: 89-102.
- HOAR, W.S. (1969). Reproduction. In "Fish Physiology" (W.S. Hoar & D.J. Randall, eds.) vol. 3, pp. 1-72. Academic Press, New York.
- HORVATH, L. (1986). Carp oogenesis and the environment. In Aquaculture of Cyprinids. R. Billard & J. Marcel eds. pp. 109-117. INRA. Paris.
- HOIRIGAN, T.F.; M. NAKAMURA; Y. NAGAHAMA; K. YAMAUCHI & E. GRAU. (1991). Histology, ultrastructure and in vitro steroidogenesis of the testes of two male phenotypes of the protogynous fish, *Thalassoma duperrey* (Labridae). Gen. Comp. Endocrinol. 83, 193-217.
- HYLLNER S.J.; D.O. OPPEN-BERNSTEN; J.V. HELVIK; B.T. QALTHER & C. HAUX. (1991). Oestradiol-17 β induces the mayor vitelline envelope proteins in both sexes in teleosts. J. Endocrinol. 131: 229-236.
- IWAMATSU, T. ; S. ISHIJIMA & S. NAKASHIMA. (1993). Movement of spermatozoa and changes in micropiles during fertilization in medaka eggs. J. Exp. Zool. 266: 57-64.
- JACKSON, L.F. & C.V. SULLIVAN. (1995). Reproduction of white Perch: The annual gametogenic cycle. Trans of Am. Fish. Soc. 124: 563-577.
- JIMENEZ-LIÑAN, M.; B.S. RUBIN & J.C. KING. (1997). Examination of guinea pig luteinizing hormone-releasing hormone gene reveals a unique decapeptide and existence of two transcripts in the brain. Endocrinology. 138, 4123-4130.
- JOHANSEN, K. (1966). Air breathing in the teleost *Synbranchus marmoratus*. Comp. Biochem. Physiol., vol 18, pp 383-395.

- KAGAWA H.; G. YOUNG & Y. NAGAHAMA. (1983). Relationship between seasonal plasma estradiol 17β and testosterone levels and *in vitro* production by ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). Biol. Reprod. 29: 301-309.
- KAH O., I. ANGLADE, E. LEPRETRE, P. DUBOURG, D. MONBRISON. (1993). The reproductive brain in fishes. Fish Physiol. and Biochem. vol 11 n°1-6: 85-98.
- KAH, O.; P. CHAMBOLLE; J. THIBAUT & M. GEFFARD. (1984). Existence of dopaminergic neurons in the preoptic region of the goldfish. Neurosci. Lett. 48: 293-298.
- KAH O., J.M. DANGER, P. DUBOURG, G. PELLETIER, H. VAUDRY & A. CALAS. (1989). Characterization, cerebral distribution and gonadotropin-release activity of neuropeptide Y (NPY) in the goldfish. Fish Physiol. Biochem. 7: 69-76.
- KAH, O.; J.G. DULKA; P. DUBOURG; J. THIBAUT & R.E. PETER. (1987). Neuro-anatomical substrate for the inhibition of gonadotropin secretion in goldfish: existence of a dopaminergic preoptico-hypophyseal pathway. Neuroendocrinol. 45: 451-458.
- KAKISAWA, S. T.; KANEKO & T. HIRANO. (1997). Effects of hypothalamic factors on somatolactin secretion from the organ-cultured pituitary of rainbow trout. Gen. Comp. Endocrinol. 105: 71-78.
- KANAMORI A.; S. ADACHI & Y. NAGAHAMA. (1988). Developmental changes in steroidogenic responses of ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) to chum salmon gonadotropin during oogenesis. Gen. Comp. Endocrinol. 72: 13-24.
- KAWAUCHI H. (1994). The special neurosecretory system in the brain and pituitary gland. Persp. Comp. Endocrinol. pp 20-23.
- KIM, M.H., Y. OKA, M. AMANO, M. KOBAYASHI, K. OKUSAWA, Y. HASEGAWA, S. KAWASHIMA, Y. SUSUKI & K. AIDA. (1995). Immunocytochemical localization of sGnRH and cGnRH-II in the brain of goldfish, *Carassius auratus*. J. Comp. Neurol. 356: 72-82.
- KIME, D.E. & N. MANNING. (1982). Seasonal patterns of free and conjugated androgens in the brown trout, *Salmo trutta*, Gen. Comp. Endocr. 48: 222-231.
- KING J.A. & R.P. MILLAR. (1985). Multiple molecular forms of gonadotropin-releasing hormones in teleost fish brain. Peptides 6: 689-694.
- KING J.A.; S. DUFOUR; Y.A. FONTAINE & R.P. MILLAR. (1990). Chromatographic and immunological evidence for mammalian GnRH and chicken GnRH-II in eel (*Anguilla anguilla*) brain and pituitary. Peptides 11: 507-514.

- KING J.A. & R.P. MILLAR. (1992). Evolution of gonadotropin-releasing hormones. Trends endocrinol. Metabol. 3: 339-346.
- KING J.A. & R.P. MILLAR. (1995). Evolutionary aspects of gonadotropin-releasing hormone and its receptor. Cell. Molec. Neurobiol. 15:5-23.
- KJESBU, O.S., H. KRYVI & B. NORBERG. (1996). Oocyte size and structure in relation to blood plasma steroid hormones in individually monitored, spawning Atlantic cod. J. Fish. Biol. 49: 1197-1215.
- KRAMER CH. & M. IMBRIANO. (1997). Neuropeptide Y (NPY) induces sex reversal in the protogynous Bluehead Wrasse, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). J. Exp. Zool. 279:133-144.
- KRAMER C.R.; M.T. CADDELL & L. BUBENHEIMER-LIVOLSI. (1993). sGnRH-A [(D-Arg6, Pro9, NEt-) LHRH] in combination with Domperidone induces gonad reversal in a protogynous fish, the bluehead wrasse, *Thalassoma bifasciatum*. J. Fish Biol. 42: 185-195.
- KREIBERG H.; G. HUNTER; E. DONALDSON; W. CLARKE & I. BAKER. (1987). Induced ovulation and spermiation in the Pacific Herring (*Clupea harengus pallasii*) using salmon pituitary preparations and a synthetic gonadotropin-releasing hormone analogue. Aquaculture, 61: 155-161.
- KOBAYASHI M., K. AIDA & I. HANYU. (1986). Annual changes in plasma levels of gonadotropin and steroid hormones in goldfish. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 52(7):1153-1158.
- KOULIS, S. & C.R. KRAMER. (1989). Human chorionic gonadotropin (hCG) induces gonad sex reversal in a protogynous fish, the bluehead wrasse, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei, Labridae). J. Exp. Zool. 252:156-168.
- LANCASTER, P.M. & C.R. TYLER. (1991). Isolation of a membrane bound protein with an affinity for vitellogenin from rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) follicles. In Proceedings of the 4th. International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (Eds. A.P. Scott; J.P. Sumpter; D.E. Kime & M.S. Rolfe) Fish Symp 91, Sheffield, p. 128.
- LAVAGNO C.C., L.A. ROMANO. & A. BOVERIS. (1992). Melanin could act as a free radical scavenger in Melano Macrophage Centers during phagocytosis. Doc. Veter. vol 43:16-21.
- LEATHERLAND, J.F.; P. COPELAND; J.P. SUMPTER & R.A. SONSTEGARD. (1982). Hormonal control of gonadal maturation and secondary sexual characteristics in coho salmon, *Onchorhynchus kisutch*, from Lakes Ontario, Erie and Michigan. Gen. Comp. Endocr. 48: 196-204.

- LEE M.F., C.F. CHANG, J.D. HUANG & A.V. SCHALLY. (1993). Microencapsulated LH-RH analog accelerated spermiation in protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. Bull.Inst. Zool. Acad. Sinica. vol 32, N° 1: 32-38.
- LE MENN, F. & J. NUÑEZ RODRIGUEZ. (1991). Receptors mediate endocytosis of VTG in fish follicle. In Proceedings of the 4th. International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (Eds. A.P. Scott; J.P. Sumpter; D.E. Kime & M.S. Rolfe) Fish Symp 91, Sheffield, pp. 293-299.
- LEPORI, N.G. (1980). Sex differentiation, hermaphroditism and intersexuality in vertebrates including man. Pissin Medical Books.
- LEPRETRE, E.; I. ANGLADE; P. WILLIOT; F. VANDESANDE; G. TRAMU & O. KAH. (1993). Comparative distribution of mammalian GnRH and chicken GnRH-II in the brain of the immature Siberian Sturgeon (*Acipenser baeri*). J. Comp. Neurol. 337: 568-583.
- LIEM K.F. (1963). Sex reversal as a natural process in the Synbranchiform fish *Monopterus albus*. Copeia 2: 303-311.
- LIEM K.F. (1968). Geographical and taxonomic variation in the pattern of natural sex reversal in the teleost fish order Synbranchiformes. J. Zool. Lond. 156: 225-238.
- LIN, H.R.; G. VAN DER KRAAK; X.J. ZHOU; J.Y. LIANG; R.E. PETER; J.E. RIVIER & W.W. VALE. (1988). Effects of [D-Arg⁶, Trp⁷, Leu⁸, Pro⁹ Net]-luteinizing hormone releasing hormone (sGnRH-A) and [Ala⁶, Pro⁹ Net]-luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH-A), in combination with pimozone or domperidone, on gonadotropin release and ovulation in the Chinese loach and common carp. Gen. Comp. Endocrinol. 69: 31-40.
- LO NOSTRO, F. & G. GUERRERO. (1996). Presence of primary and secondary males in a population of *Synbranchus marmoratus*, Bloch 1795, a protogynous fish (Teleostei - Synbranchiformes). J. Fish Biol. 49:788-800.
- LO NOSTRO F.; M. RAVAGLIA; G. GUERRERO; M.C. MAGGESE & G. SOMOZA. (1996). Inducción de la espermiación y reversion sexual mediante el tratamiento con s-GnRH-A y domperidona en el pez protoginico diandrico, *Synbranchus marmoratus* (Bloch, 1795). Resúmenes Comunicaciones p. 324. "IX Congreso Latinoamericano de Acuicultura". Coquimbo, Chile.
- LÜLING, K.H. (1980). Biotop, begleitfauna und amphibische lebensweise von *Synbranchus marmoratus* (Pisces Synbranchidae) in seitegewässern des mittleren Paraná. Bonner Zool. Beitr., yr. 1/2, n° 31, pp 111-143.
- MACCHI G.J., A. AUBONE & H.E. CHRISTIANSEN. (1993). Incidencia de patologías en ovarios de corvina rubia (*Micropogonias furneri*) y su relación con distintas zonas costeras de Uruguay y la Provincia de Buenos Aires. Atlántica, 14. In Press.

- MACCHI G.J., L.A. ROMANO & H.E. CHRISTIANSEN. (1992). Melano Macrophage Centers in Whitemouth croaker *Micropogonias furneri*, as biological indicators of environmental changes. J. Fish Biol. 40, 971-973
- MAHMOUD, S.S.; N.M. MOLONEY & H.R. HABIBI. (1996). Cloning and sequencing of the goldfish growth hormone Cdna. Gen Comp. Endocrinol. 89: 62-71.
- MARCHANT, T.A.; J.P. CHANG; C.S. NAHORNIAK & R.E. PETER. (1989). Evidence that gonadotropin-releasing hormone also functions as a growth hormone-releasing factor in the goldfish. Endocrinology. 124: 2509-2518.
- MARTOJA, R. y M. MARTOJA PIERSON. (1970). Técnicas de histología animal, Toray Masson, Barcelona, pp. 341.
- MATKOVIC, M. (1989). Algunos aspectos de la biología reproductiva de *Hoplias m. malabaricus* (Pisces: Erythrinidae). Tesis Doctoral, F.C.E.y N. UBA.
- MATKOVIC, M & A. PISANO. (1989). Final maturation and ovulation provoked by supply of homologous hypophysis in *Hoplias m. malabaricus* (Pisces, Erythrinidae). Rev. Brasil. Biol., 49(1):213-220.
- MATSUO H.; Y. BABA; R.M. NAIR; A. ARIMURA & A.V. SCHALLY. (1971). Structure of the porcine LH-and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino-acid sequence. Biochem. Biophys. Res. Commun. 43:1334-1339.
- MESEGUER J.; A. LOPEZ-RUIZ & M.A. ESTEBAN. (1994). Melano-macrophages of the seawater teleost, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*): morphology, formation and possible function. Cell. Tissue Res. 277: 1-10.
- MICALE, V. & F. PERDICHIZZI. (1990). A quantitative and histochemical study on melano-macrophage centres in the spleen of the teleost fish *Diplodus annularis* L. J Fish Biol 37: 191-197.
- MILOMAS C.; J. HINSHAW & C.V. SULLIVAN. (1992). GnRH α -induced ovulation of brown trout (*Salmo trutta*) and its effects on eggs quality. Aquaculture, 106: 379-392.
- MOMMSEN, T. & P. WALSH. (1988). Vitellogenesis and oocyte assembly. En "Fish Physiology" (Hoar W.& Randall D. eds.) vol XI - part A. pp 347-406. Academic Press. New York.
- MONTANER, A.D.; J.M. AFFANNI; M. PARK; W.H. FISCHER; A.G. CRAIG; J.P. CHANG; G.M. SOMOZA; J.E. RIVIER & N.M. SHERWOOD. (1999). Primary structure of a novel gonadotropin-releasing hormone (GnRH) variant in the brain of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). INEDITO, EN REDACCIÓN.

- MONTERO M. & S. DUFOUR. (1996). gonadotropin -releasing hormones (GnRH) in fishes. Evolutionary data on their structure, localization, regulation and function. Zool. Sci. 35:149-160.
- MUNSHI, J.S.D. & B.N. SINGH. (1968). On the respiratory organs of *Amphipnous Cuchia* (Ham. Buch.). J. Morph. 124: 423-444.
- MUNSHI, J.S.D.; K.R. OLSON; T.K. GHOSH & J. OJHA. (1990). Vasculature of the head and respiratory organs in an obligate air-breathing, the swamp eel *Monopterus albus* (= *Amphipnous Cuchia*). J. Morph. 203: 181-201.
- NAGAHAMA, Y. (1983). The functional morphology of teleost gonads. In Fish Physiology (Hoar W., Randall D. & Donaldson E. eds.) vol IX - part A. pp 223-275. Academic Press. New York.
- NAGAHAMA, Y. (1987). Gonadotropin action on gametogenesis and steroidogenesis in teleost gonads. Zool. Sci. 4: 209-222.
- NAGAHAMA, Y. (1994). Endocrine regulation of gametogenesis in fish. Review. Int. J. Dev. Biol. 38: 217-229.
- NAGAHAMA Y. (1997). 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: Mechanisms of synthesis and action. Steroids 62: 190-196.
- NAKAMURA, H.; E. FURUTA & A. SHIMOZAWA. (1992). *In vivo* response to administered carbon particles in the teleost, *Oryzias latipes*. Dokkyo J. Med. Scien. vol 19: 11-18.
- NAKAMURA, H. & A. SHIMOZAWA. (1994). Phagocytic cells in the fish heart. Arch. Histol. Cytol., vol. 57 (4): 415-425.
- NAKAMURA, H.; a. SHIMOZAWA & s. KIKUCHI. (1993). Melano-macrophage centre-like structure in the heart of the Medaka, *Oryzias latipes*. Ann. Anat. 175: 59-63.
- NAKAMURA, M. & H. TAKAHASHI. (1973). Gonadal sex differentiation in *Tilapia mossambica*, with special regard to the time of estrogen treatment effective in inducing complete feminization of genetic males. Bull. Fac.Fish. Hokkaido Univ. 24: 1-13.
- NAGAHAMA, Y, M. YOSHIKUNI, M. YAMASHITA & M. TANAKA. (1995). Regulation of oocyte maturation in fish. In Sherwood, N.M. and Hew, C.L. eds. Fish Physiology, Vol. XIII. New York: Academic Press, pp. 393-439.
- NGAMVONGCHON S.; N SHERWOOD; C. WARBY & J RIVIER. (1992). Gonadotropin-releasing hormone from Thai Catfish: chromatographic and physiological studies. Gen Comp. Endocrinol. 87: 266-274.

- NELSON, J. (1994). Fishes of the world. 3rd. Edition. (John Wiley & Sons, Inc.). New York. pp. 600.
- NIELAND D.L. & CH.A. WILSON. (1993). Reproductive biology and annual variation of reproductive variables of black drum in the northern gulf of Mexico. Trans. of Am. Fisheries Soc. 122:318-327.
- OKUZAWA K.; M. AMANO; M. KOBAYASHI; K. AIDA; I. HANYU; Y. HASEGAWA & K. MIYAMOTO. (1990). Differences in salmon GnRH and chicken GnRH-II contents in discrete brain areas of male and female rainbow trout according to age and stage of maturity. Gen. Comp. Endocrinol. 80: 116-126.8
- OKUZAWA K.; J. GRANNEMAN; J. BOGERD; H.J. GOOS; Y. ZOHAR & H. KAGAWA. (1996). Distinct expression of GnRH genes in the red seabream brain. 3rd. International Symposium of FishEndocrinology, Kakodate, Japan. p. 0-40. Abstract.
- ONITAKE, K. & T. IWAMATSU. (1986). Immunocytochemical demonstratipon of steroid hormones in the granulosa cells of the medaka, *Oryzias latipes*.J. Exp. Zool. 239: 97-103.
- PANDIAN, T.J. & S.G. SHEELA. (1995). Hormonal induction of sex reversal in fish. Aquaculture 138: 1-22.
- PARHAR, S.I. & M. IWATA. (1994). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons project to growth hormone and somatolactin cells in the Steelhead trout. Histochemistry 102:195-203.
- PATI, D. & H.R. HABIBI. (1993) Characterization of gonadotropin-releasing hormone receptors in goldfish ovary: Variations during follicular development. Am. J. Physiol. 264: 227-234.
- PEARSE A.G. (1985) Histochemistry. Theoretical and applied. Vol. 2. Analitical Technology, pp 874-928 Fourth Edition. Churchill Livingstone, New York.
- PETER, R.E. & C.R. PAULENCU.(1980). Involvement of the preoptic region in gonadotropin release-inhibition in goldfish, *Carassius auratus*. Neuroendoc. 31: 133-141.
- PETER R. E. & K.L. YU. (1997). neuroendocrine regulation of ovyulation in fishes: basic and applied aspects. Reviews in Fish Biology and Fisheries 7: 173-197.
- PETER, R.E.; J.P. CHANG; C.S. NAHORNIAK; R.J. OMELJANIUK; M. SOKOLOWSKA; S.H. SHIH & R. BILLARD. (1986). Interactions of catecholamines and GnRH in regulation of gonadotropin secretion in teleost fish. Recent Progr. Horm. Res. 42: 513-548.

- PETER R.; H.R. HABIBI; T.A. MARCHANT; C. NAHORNIK. (1987a). Vertebrate gonadotropin-releasing hormones: Phylogeny and structure. Function relationships. Vol. 519. En *Annals of the New York academy of Sciences*. pp: 219-309.
- PETER, R.E.; H.R. LIN; G. VAN DER KRAAK. (1988). Induced ovulation and spawning of cultured freshwater fish in China: Advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonists. *Aquaculture* 74: 1-10.
- PETER, R.E.; M. SOKOLOWSKA & C.S. NAHORNIK. (1987b). Comparison of [D-Arg⁶, Trp⁷, Leu⁸, Pro⁹ Net]-luteinizing hormone releasing hormone (sGnRH-A) and [Ala⁶, Pro⁹ Net]-luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH-A), in combination with pimozide, in stimulating gonadotropin release and ovulation in the goldfish, *Carassius auratus*. *Can. J. Zool.* 65: 987-991.
- PETER R.; V.L. TRUDEAU & B.D. SLOLEY. (1991). Brain regulation of reproduction in teleosts. *Bull. Inst., Acad. Sinica, Monograph* 16: 89-118.
- PETRINO, T.R., M.S. GREELEY Jr., K. SELMAN, Y-W.P. LIN & R.A. WALLACE. (1989). Steroidogenesis in *Fundulus heteroclitus*. II. Production of 17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogesterone, testosterone, and 17 β -estradiol by various components of the ovarian follicle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 76: 230-240.
- POWELL, J.F.; S. RESKA-SKINNER; M.O. PRAKASH; W.H. FISCHER; M. PARK; J.E. RIVIER; A.G. CRAIG; G.O. MACKIE & N.M. SHERWOOD. (1996). Two new forms of gonadotropin-releasing hormone in a protochordate and the evolutionary implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 10461-10464.
- POWELL, J.F., Y. ZOHAR, A. ELIZUR, M. PARK, W. FISCHER, A. CRAIG, J. RIVIER, D. LOVEJOY & N. SHERWOOD. (1994). Three forms of gonadotropin-releasing hormone characterized from brains of one species. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 91: 12081-12085.
- PRAT, F.; S. ZANYU; M. CARILLO; A. de MONES & A. FOSTIER. (1990). Seasonal changes in plasma levels of gonadal steroids of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *gen. comp. Endocr.* 78: 361-373.
- QUÉRAT, B. (1994). Molecular evolution of the glycoprotein hormones in vertebrates. En "Perspectives in Comparative Endocrinology" (Ed. por Davey K.G., R.E. Peter & S.S. Tobe). NRCC, Ottawa, Canada. pp.27-35.
- RAMIREZ J. (1984). Aspects of the reproductive biology of three morphospecies of the genus *Hypoplectrus chlorurus*, *H. puella* and *H. unicolor*. Unpubl. MS thesis. University of Puerto Rico, Mayaguez. Puerto Rico.
- RAVAGLIA M.A. & M.C. MAGGESE. (1995). Melano-macrophages Centres in the gonads of the swamp eel *Synbranchus marmoratus* Bloch, (Pisces, Synbranchidae). Histological and histochemical characterization. *J. Fish Dis.*, 18: 117-125.

- REDDING, J.M. Y R. PATINO. (1993). Reproductive Physiology. In "The Physiology of Fishes" (D.H. Evans editor). Boca Raton. Florida. CRC press, Inc., p. 503-534.
- REINBOTH, R. (1983). The peculiarities of gonad transformation in teleosts. *Different.* 23 (suppl.):82-86.
- REINBOTH R. AND S. BRUSLE-SICARD. (1997). Histological and ultrastructural studies on the effects of hCG on sex inversion in the protogynous teleost *Coris julis*. *J. Fish Biol.* 51: 738-749.
- RIEHL, R. & M. KOKOSCHA. (1993). A unique surface pattern and micropilar apparatus in the eggs of *Luciocephalus sp.* (Perciformes, Luciocephalidae). *J. Fish Biol.* 43:617-620.
- RINCHARD, J; P.PONCIN & P. KESTERMONT. (1998). Croissance ovocytaire et regulation steroïdienne chez les poissons a pontes unique et multiples: une revue. *Annls. Limnol.* 34(2): 211-225.
- RINGUELET, R.A.; R.H. ARAMBURU y A.A. ARAMBURU. (1967). Los peces Argentinos de Agua Dulce. Comisión de investigación Científica, Gobernación de la Prov, de Buenos Aires, La Plata. 602 pp.
- ROBERTS R.J. (1975) Melanin-containing cells of teleost fish and their relation to disease. pp 399-428. In *The Pathology of Fishes*. (Ribelin W. & Migaki G. eds.) Madison. Wisconsin, University of Wisconsin Press.
- ROBERTSON, D.R. (1972). Social control of sex reversal in a coral-reef fish. *Science*, N.Y. 177: 1007-1009.
- ROBERTSON, D.R. , G. JUSTINES. (1982). Protogynous hermaphroditism and gonocorism in four Caribbean reef gobies. *Env. Biol. Fish.* 7: 137-142.
- ROEDE M.J. (1972). Color as related to size, sex and behavior in seven Caribbean labrid fish species (genera *Thalassoma*, *Halichoeres*, *Hemipteronotus*). *Stud. Fauna Curaçao and other Caribbean Islands* 42, 264 pp.
- ROMER, A.S. (1966). *Vertebrate Paleontology*, 3rd ed. Chicago. University of Chicago Press. 468pp.
- ROSEN, D.E. & P.H. GREENWOOD. (1976). A fourth neotropical species of Synbranchid eel and the phylogeny and systematics of Synbranchiform fishes. *Bull. Am. Mus. Nat. His.* vol. 157(1) 70 pp.
- ROSEN, D. & A. RUMNEY. (1972). Evidence of a second species of *Synbranchus* (Pisces, teleostei) in South America. *Amer Mus. Novitates*, N° 2497, pp. 1-45.

- ROSENBLUM, P.M.; L. YAMADA; I.P. CALLARD & G.V. CALLARD. (1985). Validation of radioimmuno-assaysystem for measurement of 11-keto- and 11 β -hydroxytestosterone in teleost blood. *Comp. biochem. Physiol.* 82B: 659-665.
- SADOVY, I. & D. SHAPIRO. (1987). Criteria for the diagnosis of hermaphroditism in fishes. *Copeia* 1, 136-156.
- SANGALANG, G.B. & H.C. FREEMAN. (1977). A new sensitive and precise method for determinig testosterone and 11-ketosterone in fish plama by radioimmunoassay. *Gen and Comp. Endocrinol.* 32: 432-439.
- SCHULZ, R.; P.T. BOSMA; M.A. ZANDBERGEN; M. VAN DER SANDEN; W. VAN DIJT; J. PEUTE; J. BOGERD & H. GOOS. (1993). Two gonadotropin-releasing hormones in the African Catfish, *Clarias gariepinus*: Localization, pituitary receptor binding and gonadotropin release activity. *Endocrinolgy* vol. 133, N°4 1569-1577.
- SCOTT, A.P.; D. MACKENSIE & N. STACEY. (1984). Endocrine changes during natural spawning in the withe sucker, *Catostomus commersoni*. II: Steroid hormones. *Gen. Comp. Endocr.* 56:349-359.
- SEIGNEUR, G.N. (1984). Eficiencia del MS222, Quinaldina y Benzocaina como anestésicos en *Rhamdia sapo* (Valenciennes, 1840). *Mems Asoc. Latioam. Acuicult.*, 5(3): 633-639.
- SELMAN, K. & R. WALLACE. (1986). Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. *Amer. Zool.* 26: 173-192.
- SELMAN, K. & R. WALLACE. (1989). Cellular aspects in oocyte growth in teleosts. *Zool. Sci.* 6: 211-231.
- SELMAN, K, R.A. WALLACE & V. BARR. (1986). Oogenesis in *Fundulus heteroclitus*. IV. Yolk vesicle formation. *J. Exp. Zoology.* 239: 277-288.
- SELMAN, K, R. WALLACE & D. PLAYER. (1991). Ovary of the seahorse, *Hippocampus erectus*. *J. Morphol.* 209:285-304.
- SHACKLEY, S.E. & P.E. KING. (1977). Oogenesis in a marine teleost, *Blennius pholis* L. *Cell. Tissue Res.* 181: 105-128.
- SHEHADEH, Z.H.; C.M. KUO & K.K. MILISEN. (1973). Validation of an in vivo method for monitoring ovarian development in the grey mullet (*Mugil cephalus*). *J Fish. Biol.* 5:489-496.-
- SHERWOOD, N.M; B. HARVEY; M. BROWNSTEIN & L. EIDEN. (1984). Gonadotropin-relesing hormone (GnRH) in striped mullet (*Mugil cephalus*), milkgish (*Chanos chanos*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*): comparison with salmon GnRH. *Gen. Comp. Endocrinol.* 55: 174-181.

- SHERWOOD, N.M.; S. DOROSHOW & V. LANCE. (1991). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in bony fish that are phylogenetically ancient: reedfish (*Calanoichtys calabaricus*), sturgeon (*Acipenser transmontanus*) and alligator gar (*Lepisosteus spatula*). Gen. Comp. Endocrinol. 84: 44-57.
- SHERWOOD, N.M.; K. von SCHALBURG & D.W. LESCHEID. (1997). Origin and evolution of GnRH in vertebrates and invertebrates. In "GnRH neurons: Gene to behavior" (Parhar I.S. and Sakuma, Y. Eds.), Brain Shuppan, Japan, pp. 3-26.
- SIMPSON, T.H. & R.S. WRIGHT. (1977). A radioimmunoassay for 11-oxotestosterone: its application in the measurement of levels in blood serum of rainbow trout (*S. gairdneri*). Steroids 29: 383-398.
- SMITH, C.L. (1965). The patterns of sexuality and the clasification of serranid fishes. Am. Mus. Novit. 2207:1-20.
- SOMOZA G., A.V. STEFANO, J.L. D'ERAMO, L.F. CANOSA & O. FRIDMAN. (1994). Immunoreactive GnRH suggesting a third variant form of GnRH in addition to cGnRH-II and sGnRH in the brain and pituitary gland of *Prochilodus lineatus* (Characiformes). Gen Comp. Endocrinol. 94:44-52.
- SOWER S.; Y.C. CHIANG; S. LOVAS & J.M. CONLON. (1993). Primary structure and biological activity of a third gonadotropin-releasing hormone from lamprey brain. Endocrinology 132: 1125-1131.
- SRIVASTAVA, S.J. & R., SINGH. (1990). Seasonal changes in the ovary of a freshwater murrel *Channa punctatus* (Bloch). Rev. Cienc. Biomed. 11: 105-118.
- STEFANO A.V. (1993). Evidencias cromatográficas e inmunológicas acerca de la presencia de variantes moleculares de GnRH en cerebro e hipófisis de sábalo *Prochilodus lineatus* (Characiformes). Seminario de Licenciatura de la Carrera de Cs. Biológicas. U.B.A.
- STEFANO A.V. (1999). Caracterización bioquímica de las variantes de GnRH (gonadotropin-releasing hormone) presentes en cerebro e hipófisis de pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. Localización neuroanatómica y relación con distintas hormonas hipofisarias. Tesis Doctor en Ciencias Biológicas. UBA.FCEyN. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- STEFANO, A.V; L. CANOSA; J.L. DÉRAMO; O. FRIDMAN; J.M. AFFANNI & G.M. SOMOZA. (1997). GnRH molecular variants in the brain and pituitary gland of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes). Immunological and chromatographic evidence for the preence of a novel molecular variant. Comp. Biochem. Vol. 118C, Nº 3: 335-345.
- STEFANO A.V., P.G. VISSIO, D.A. PAZ, G.M. SOMOZA, M.C. MAGGESE & G. BARRANTES. (1999). Colocalization of GnRH binding sites with gonadotropin-, Somatotropin-, Somatolactin-, and Prolactin-expressing pituitarycells of the pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, *in vitro*. Gen. and Comp. Endocrinol. 00: 1-8.

- STOECKEL J. & R.J. NEVES. (1992). Comparision of methods for viewing the germinal vesicle in fish oocytes. *The Progressive Fish-Culturist*. 54: 115-118.
- STRÜSSMAN, C.A. (1989). Basic studies on seed production of pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Ph. D. Thesis, Tokyo University of Fisheries, Tokyo. pp 351.
- STUART-KREGOR, P.A.C; J.P. SUMPTER & J. DODD. (1981). the involvment of gonadotrophin and sex steroids in the control of reproduction in the parr and adults of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Biol.* 18: 59-72.
- SWANSON, P.; K. SUZUKI; Y. KAWAUCHI & W.W DIKHOFF. (1991). Isolation and characterization of two coho salmon gonadotropins, GTH-I and GTH-II. *Biol. Reprod.* 44: 29-38.
- TAKAHASHI, H. & K. TAKANO. (1971). Sex hormone-induced precocious hypertrophy and ciliation of epithelial cells in the ovarian lumen of the goldfish. *Annot. Zool. Jpn.* 44: 32-41.
- TANG, F. S.T.H. CHANG Y B. LOFTS. (1974). Effects of mammalian luteinizing hormone on the natural sex reversal of the ricefield eel , *Monopterus albus* (Zuiew). *Gen. Comp. Endocrinol.* 24, 242-248.
- TAO Y; H LIN; G. VAN DER KRAAK & R. PETER. (1993). Hormonal induction of precocious sex reversal in the ricefield eel, *Monopterus albus*. *Aquaculture*, 118: 131-140.
- TESORIERO, J.V. (1977). Formation of the chorion (zona pellucida) in the teleost, *Oryzias latipes*. I. Morphology of early oogenesis. *J. Ultraestr. Res.* 59: 282-291.
- TRUDEAU, V.L. & R.E. PETER. (1995). Functional interactions between neuroendocrine systems regulating GtH-II release. In Goetz, F.W. & Thomas P. eds. *Reproductive Physiology of Fish*. 1995. Austin, TX: Fish Symposium 95, pp. 44-48.
- TRUDEAU, V.L.; C.K. MURPHY; H.R. HABIBI; B.D. SLOLEY & R.E. PETER. (1993). Effects of sex steroids treatments on gonadotropin-releasing hormone-stimulated gonadotropin secretion from the goldfish pituitary. *Biol. Reprod.* 48: 300-307.
- TRUDEAU, V.L.; R.E. PETER & B.D. SLOLEY. (1991). Testosterone and estradiol potentiate the serum gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in goldfish. *Biol. Reprod.* 44: 951-960.
- TYLER, C.R. (1991). Vitellogenesis in salmonids. In *Proceedings of the 4th. International Symposium on Reproductive Physiology of Fish* (Eds. A.P. Scott, J.P. Sumpter, D.E. Kime and M.S. Rolfe) FishSymp91, Sheffield, pp 295-299.

- TYLER, C.R. & J.P. SUMPTER. (1996). Oocyte growth and development in teleosts. *Rev. Fish Biol. Fisheries*. 6: 287-318.
- VAN den HURK, R. & J. PEUTE. (1979). Cyclic changes in the ovary of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, with special reference to sites of steroidogenesis. *Cell. Tissue Res.* 199: 289-306.
- VAN DER KRAAK, G & E.M. DONALDSON. (1986). Steroidogenic capacity of coho salmon follicles through the periovulatory period. *Fish Physiol. Biochem.* vol 1(4): 179-186.
- VAN WEERD J.H. & C.J. RICHTER. (1991). Sex pheromones and ovarian development in teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.* vol 100A, n°3: 517-527.
- VENKATESH, B.; C.H. TAN & T.J. LAM. (1989). Blood steroids level in the goldfish: Measurement of six ovarian steroids in small volumes of serum by reverse-phase high-performance liquid chromatography and radioimmunoassay. *Gen. Comp. Endocrinol.* 76: 398-407.
- VISSIO P.G.; D.A. PAZ & M.C. MAGGESE. (1996). The adenohipophysis of the swamp eel, *Synbranchus marmoratus*, an immunocytochemical analysis. *Biocell* 20(2):155-161.
- VISSIO P.G., A.V. STEFANO, G.M. SOMOZA, M.C. MAGGESE & D.A. PAZ. (1999). Close association among GnRH fibers (Gonadotropin-releasing hormone) fibers and Gonadotropin, growth hormone, somatolactin and prolactin expressing cells in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *Fish Physiol. Biochem.* 21:121-127.
- VOLLMANN-SCHIPPER, F. (1978). Transporte de peces vivos. Ed. Acribia. Zaragoza - España. PP. 90.
- WALLACE, R.A. (1985). Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. En *Developmental Biology*, vol 1, (L. W. Browder Eds.). Plenum Press, New York, pp. 127-177.
- WALLACE, R.A. & K. SELMAN. (1981). Cellular and dynamics aspects of oocyte growth in teleosts. *Am. Zool.* 21:325-343.
- WALLACE, R.A. & K. SELMAN. (1990). Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *J. Electron Microsc. Tech.* 16: 175-201.
- WARNER R.R. (1975) The adaptive significance of sequential hermaphroditism in animal. *Am. Nat.* 109, 61-82.
- WEBER G.M.; J.F. POWELL; M. PARK; W.H. FISCHER; A.G. CRAIG; J.E. RIVIER; U. NANAKON; I.S.; S. NGAMVONGCHON; E.G. GRAU & N.M. SHERWOOD. (1997). Evidence that gonadotropin releasing hormone (GnRH) functions as a prolactin-releasing factor in a teleost fish (*Oreochromis*

- mossambicus*) and primary structures for three native GnRH molecules. J. Endocrinol. 155: 121-132.
- WEIL, C.; B. BRETON & P. REINAUD. (1975). Etude de la réponse hypophysaire à l'administration de Gn-RH exogène au cours du cycle reproducteur annuel chez la carpe *Cyprinus carpio* L. C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D 280: 2469-2472.
- WHITE, S.A.; T.L. KASTEM; C.T. BOND; J.P. ADELMAN & R.D. FERNALD. (1995). Three gonadotropin-releasing hormone genes in one organism suggest novel roles for an ancient peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8363-8367.
- WOLKE R.E., R.A. MURCHELANO, C. DICKSTEIN & C.J. GEORGE. (1985). Preliminary evaluation of the use of Macrophage Aggregates (MA) as fish health monitors. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 35:222-227.
- WOURMS, J.P. (1976). Annual fish Oogenesis. I. Differentiation of the mature oocyte and formation of the primary envelope. Devl. Biol, 50:338-354
- YAMAGAMI, K; T.S. HAMAZAKI; S. YASUMASU; K. MASUDA & I. IUCHI. (1992). Molecular and cellular basis of formation, hardening, and breakdown of the egg envelope in fish. Int. Rev. Cytol. vol 136: 51-91.
- YAMAMOTO, T. (1969). Sex differentiation. In Fish Physiology (Hoar W. and Randall D. eds.) vol 3. pp 117-175. Academic Press. New York.
- YEUNG, W.S.B.; H. CHEN & S.T.H. CHAN. (1993). Effects of LH and LHRH-Analog on gonadal development and *in vitro* steroidogenesis in the protogynous *Monopterus albus*. Gen Comp. Endocrinol. 89:323-332.
- YU, K.L., N. SHERWOOD & R. PETER. (1988). Differential distribution of two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in discrete brain areas of goldfish (*Carassius auratus*). Peptides 9: 625-630.
- YU, K.L; X.W. LIN; J.C. BASTOS & R.E. PETER. (1997). Neural regulation of GnRH in teleost fishes. In "GnRH neurons: Gene to Behavior" (Parhar, I.S. and Y. Sakuma eds.) pp 277-313. Tokyo: Brain Shuppan Publishers.
- ZAMBONI, L. (1972). Comparative studies on the ultrastructure of mammalian oocytes. In Oogenesis. (Biggers, J.D. and Schuetz, A.W. eds.) pp 5-46. University Park Press. Baltimore.
- ZAPATA A. (1983). Phylogeny of the fish immune system. Bull. Inst. Pateur 81: 175-186.
- ZOHAR, Y, A. ELIZUR, N. SHERWOOD, J. POWELL, J. RIVER & N. ZAMORA. (1995). Gonadotropin-releasing hormones present in the brain of gilthead seabream, *Sparus aurata*. Gen. Comp. Endocrinol. 97: 289-299.

- ZUASTI, A.; JARA, J.R.; FERRER, C. & SOLANO, F.. (1989). Occurrence of melanin granules and melanosynthesis in the kidney of *Sparus auratus*. Pigment Cell. Res. 2: 93-99.