

Tesis de Posgrado

Espermatogénesis, ciclo anual e inducción hormonal de la espermiación en el pez protogínico diándrico, *Synbranchus marmoratus* Bloch, 1795 (Teleostei, synbranchidae)

Lo Nostro, Fabiana Laura

2000

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:

Lo Nostro, Fabiana Laura. (2000). Espermatogénesis, ciclo anual e inducción hormonal de la espermiación en el pez protogínico diándrico, *Synbranchus marmoratus* Bloch, 1795 (Teleostei, synbranchidae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3307_LoNostro.pdf

Cita tipo Chicago:

Lo Nostro, Fabiana Laura. "Espermatogénesis, ciclo anual e inducción hormonal de la espermiación en el pez protogínico diándrico, *Synbranchus marmoratus* Bloch, 1795 (Teleostei, synbranchidae)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2000. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3307_LoNostro.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires, Argentina
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

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

**"ESPERMATOGÉNESIS, CICLO ANUAL e INDUCCIÓN
HORMONAL de la ESPERMIACIÓN EN EL PEZ
PROTOGÍNICO DIÁNDRICO, *Synbranchus marmoratus*
Bloch, 1795 (TELEOSTEI, SYNBRANCHIDAE)."**

Autor: Fabiana Laura Lo Nostro

Director: Dra. Graciela Alicia Guerrero

Laboratorio de Embriología Animal
Departamento de Ciencias Biológicas

Diciembre de 2000

“Espermatogénesis, ciclo anual e inducción hormonal de la espermiación en el pez protogínico diándrico, *Synbranchus marmoratus* Bloch, 1795 (Teleostei, Synbranchidae).”

RESUMEN

En el presente estudio se ha determinado que, en las zonas muestreadas en Argentina, la anguila criolla, *S. marmoratus*, es una especie protogínica diándrica, presentando dos tipos de machos: los primarios, que nacen como tales y los secundarios que provienen de la reversión sexual de hembras funcionales. La población estudiada presentó un 20% de machos primarios y un 80% de secundarios.

Utilizando técnicas para microscopía óptica y electrónica, se caracterizaron anatómica e histológicamente las gónadas de ambos tipos de machos y de los revertantes así como la espermatogénesis y el ciclo testicular anual. Ambos machos poseen testículos de tipo lobular irrestricto y la espermatogénesis se desarrolla a lo largo del año. Las gónadas poseen un compartimiento germinal, organizado en lóbulos donde la diferenciación celular es sincrónica dentro de cada espermatocisto. En el compartimiento intersticial se observan células de Leydig, células mioideas, fibras colágenas y vasos sanguíneos.

El ciclo anual fue dividido en 5 clases reproductivas: regresada, maduración temprana, maduración media, maduración final y en regresión, basándose en los cambios del epitelio germinal y en la preponderancia de los distintos tipos de células germinales. Se observó la presencia de un epitelio germinal permanente y no se han encontrado diferencias entre ambos tipos de machos.

Se identificaron las formas de GnRH en cerebro (salmón y chicken-II). Se indujo artificialmente la espermiación utilizando un análogo superactivo de GnRH y un antagonista dopaminérgico, obteniéndose un 100% de liberación de esperma a la tercera semana de tratamiento. Esto se corroboró a nivel histológico. Se observó un aumento significativo de los niveles de testosterona y estradiol en sangre respecto de los animales control.

Palabras claves: peces, Synbranchiformes, anguila criolla, reproducción, testículo, ciclo anual, espermatogénesis, epitelio germinal, GnRH, domperidona, inducción de la espermiación, reversión sexual, hermafroditismo, protogínico diándrico.

“Spermatogenesis, annual cycle and hormonal induction of spermiation in the protogynic diandric fish *Synbranchus marmoratus* Bloch, 1795 (Teleostei, Synbranchidae)”

ABSTRACT

The swamp eel, *Synbranchus marmoratus*, is a protogynic, diandric fish having two types of males: primary males, constituting only 20% of the population studied, develop directly as males. Secondary males made up 80% of the population and develop from sex reversal of functional females. Light and electron microscopy were used to study the anatomy of testes in both types of males, spermatogenesis, and changes during the annual reproductive cycle.

Testes were unrestricted, with respect to the distribution of spermatogonia, and lobular. Within the lobules, the germinal epithelium had distinct annual changes in spermatogenesis. When reproductive, spermatogenesis was confined to spermatocysts whose borders were composed of Sertoli cell processes and within which sperm maturation was synchronous. During the annual reproductive cycle, five maturation classes were observed that were defined by changes in the germinal epithelium: early maturation, mid maturation, late maturation, regression, and regressed. Sertoli and germ cells formed a permanent germinal epithelium, i. e. it was present throughout the year. The testis interstitial compartment was composed of Leydig cells, myoid cells, collagen, and blood vessels.

Two gonadotropin releasing-hormone (GnRH) brain forms were characterized: salmon (sGnRH) and chicken II (cGnRHII). Hormonal induction of spermiation were carried out using a superactive GnRH analogue and a dopaminergic antagonist. Histological analysis demonstrated that the treatment induced 100% spermiation within three weeks. Serum testosterone and estradiol levels were significantly higher in treated than in control swamp eels.

Key words: fish, Synbranchiformes, swamp eel, reproduction, testis, annual cycle, spermatogenesis, germinal epithelium, GnRH, domperidone, induction of spermiation, sex reversal, hermaphroditism, protogynic diandric fish.

AGRADECIMIENTOS...

“... y ahora, las pinceladas de sentimentalismo se alzan al poder, se encaraman cargadas de sacos de colores, sacos de ilusión azul, de noches negras y días blancos, de voces rojas y notas verdes, un saco muy grande de nervios grises y otro más grande de sueños de todos los colores y en todos ellos... gracias, gracias y más gracias. Nada de lo hecho aquí hubiera sido posible de haber estado sola, sin una mano amiga cerca (vaya lista interminable!). De nada sirve si no puedo serles agradecida...”

“... y un agradecimiento es la tapa que cierra el tarro de una esencia elaborada por muchas manos, manos sabias como las de la Dra. Graciela Alicia Guerrero, que sin todo su apoyo, conocimientos, inigualable calidad humana y obviamente el espacio que me destino en el Laboratorio de Embriología Animal (que no es poco considerando mis dimensiones), nada de todo esto hubiera sido posible. Toda tu paciencia, dedicación, empeño e insistencia, algún día te serán recompensados.

... y gracias a la mano de la Dra. M.C. Maggese como consejera de tesis y por darme todo el soporte necesario para terminar esta travesía en libertad.

... y gracias al Dr. Gustavo “Mono” Somoza, no sólo por supervisar y guiar el trabajo endocrinológico, sino por enseñarme a razonar, por sus ideas, sus contactos y sus retos!

... y gracias a la mano que me tendió la U.B.A, Facultad de Ciencias. Exactas y Naturales, Departamento de Ciencias Biológicas, ya que obtuve de ella mi formación de grado, mis becas, mi formación científica y docente en total libertad.

... y aparecieron manos sigilosas llenas de amor y paciencia, las de mis amigos y compañeros de ruta y de vida, de campañas, de congresos, de risas y llantos y mil horas de convivencia en el “famoso Laboratorio 80”: a Cristian, que dúo hacemos, amigo mío!!!; a Marito, mi hermano de leche; a Dante, un gran pequeño genio vestido de ángel (lástima que fume tanto) y a Paula (y los secretos y buenos ratos compartidos). No tengo palabras para agradecerles y explicarles lo que ustedes y sus familias (Diana, Lara, Santiago, Fabito, Fermín, Emiliano, Anita y Sole) significaron y significaran en mi trabajo científico y en mi vida, por siempre.

... y las manos tersas de los mas jóvenes (y no tan jóvenes) de Embrio: Silvi (jamás pierdas tu risotada), Lucecita (que haría sin vos y tu calma!), Juan (estás ahí?), Facu (no abandones tus excelentes valores), Fernando (tu orden infinito), Matías (tu compañía, tus razonamientos y salidas!), Nati (que polenta!), Gra R.V. y “la” Ceci... Más de una vez tomé su energía para poder seguir adelante. Todos ustedes de una u otra manera, han aportado algo a todo esto.

... y aparecieron las manos maduras de mis “amigos-tesoro”, que conocí durante mi carrera y que nada ni nadie me quitará: Ale y Lau (mis hermanas de leche, las del irrompible Akelarre); Tincho (lo más recomendable para la paz interior y la estadística), Romarie (y toda su pila!), Gus V. (lastima tu cuadro), el Colo (amigo y servicial hasta el infinito), Marielita (dulce como pocas), Ale G. (tus aventuras de vida), Leito (tu pucho en medio de la risa), Basha (la mejor compañía), Juan (tus halagos), Nachi (tus mates entre papeles), Guille (tus chistes, únicos en el mundo), Ale Nu. (nos quejamos, no?), Dé (que paciencia!!), los sNRPs (travesuras de adolescentes). Nunca dejaron de apoyar mi pasión por este trabajo y por los peces, aun cuando era poco lo que se entendía, no?

... y se brindaron abiertas las manos de los amigos-vecinos: Pablo C., Cari F. y Hernán A. quienes me adentraron en el mundo óptico y electrónico y en el concepto de “equipo y tráfico ilegal” (¿?). A Dieguito R.G., Cari L., Fabián Cr., Lilia L., Luisa F., Gladys H. y Ale F. que con sus habilidades me resolvieron más de un problema histológico... (aparte de los prestamos de material, obvio!). A Nora C., Andre P. y Fabián C. que dejaron que entrara y saliera de sus cosas, ideas y pensamientos indiscriminadamente como vecinos y amigos! A Andre S. por estar siempre con las manos y el corazón abiertos para dar. A Cynthia A., por compartir su mundillo

de tiburones, por su eterna energía y su hermosa amistad. Carlitos L. (soy tu lastre desde el CBC!!), Diana E., Claudio L., Alberto K., Pablo P. (por su compañía y su compu!), Juan Pablo V., la "santa" Sra. Isabel y su ultramicrotomo!; Albert V., Marce A., Felipe R., Klaus, Silvi, Ana, Karen, Rich, Mabel y Guido. Tal vez no sepan que sus palabras, gestos, ideas, sonrisas o enojos me ayudaron a resolver mil inconvenientes de todo tipo y color.

... y alguna vez estreche fuerte las manos de mis amigos de la adolescencia para no caer; los amigos de "la Villa" (sus compañeros y bebés): Erica, Debo, Mari, Alfred, Paulita, Mariano, Claudio, Male y Vir con quienes crecí, aprendí, me cuidaron y los cuide y supere mil barreras. Gracias por ese amor tan especial que me dan, estén donde estén y a la manera de cada uno...

... y vuelvo a estrechar manos "nuevas de amigos nuevos": Alberto y Analia, Willy y la Toli y sus 3 ángeles; Adri y Ma. Elena, una sonrisa de ustedes le da fuerzas a cualquiera para seguir. A vos Vale, Lawrence y Nayla porque sus papás y Dios, así lo quisieron. A toda la gente hermosa que conocí a través de "Sociedad Océano", nuestra escuela de buceo, que hizo que el mundo subacuático fuera más maravilloso aun.

... y las manos que señalaron el camino de mi corazón: I. Vignes y E. Meyer. Es en parte responsabilidad de ellas haberme enseñado a pensar libremente y saber elegir lo que siempre quise estudiar. También a toda la gente linda del Cole que me dejo acercarme tan tempranamente a los bichos... Rubén, Hernán, Fabián, Ana...

... y la mano profesional de los de "allá". La del Dr. Glen Van der Craak (Canadá) y la mano amigaza del Dr. Harry "Fishman" Grier, Linda e Ian (U.S.A.) quienes no sólo me permitieron trabajar en sus laboratorios y donaron parte de su tiempo sino que me dieron la oportunidad de ser su amiga e ingresar a un mundo infinitamente gigante: el del trabajo en equipo sin importar las distancias.

... y aparecieron una vez más las manos mas amorosas, sinceras, incondicionales y las de más experiencia, las que todo lo soportan, las de Betty y Juan, mis padres. Sin ustedes dos allí, yo no estaría aquí. Ven? La pelearon, me enseñaron el verdadero valor de las cosas y del conocimiento con su apoyo y amor infinito y valió la pena... Y gracias las manos de Lucia (la que se fue y la que vendrá), la mejor nonna del mundo, por sentarte a mi lado en la tierra y en el cielo y guiarme. A vos Franco, porque tus manos son las más puras, porque sos el mas pequeño y el que hace sentir que vale la pena. A vos Gabi, mi único hermano, mayor y de sangre, por defenderme con tus manos de todo y de todos para llegar acá.... aun cuando no te quedaba muy claro mi destino. Esto ES para ustedes.

... y aparecieron las manos que apoyan, las de mi familia política, de acá y de allá: Moni, la Memé y el Pepé, Ale, Juli, Dany, Esteban, Sofi y Babu... siempre ahí, cerquita de mi corazón, alegrando incondicionalmente mis días con hermosas palabras y gestos... y a la mano de Aldo, desde la parte del cielo en la que estás.

... y aparecieron las manos llenas de caricias, de amor y sin descanso de Pablo. El "gracias" que te toca es el más grande. No sólo por todo el amor –y el humor- más grande del mundo que me das a diario sino por el ánimo, los consejos de mejor amigo, la paciencia que sólo vos puedes darme como mi esposo y por creer en mi. Como en Caviahue. Como el amor de mi vida: "siempre con vos y en vos".

... y las que no tienen manos y siendo las protagonistas... las hasta ahora desconocidas (y benditas) anguilas: *S. marmoratus* -juro que en otro momento utilicé otros adjetivos calificativos-. Sepan disculpar su involuntaria participación. Ustedes hicieron que esto fuera posible y que viajaran por el mundo entero sin saberlo. Ahora, ya somos un equipo.

... y gracias a Tolkien, a Harry Potter y a Amadeus por acompañar mis horas de insomnio. Y gracias a las manos de Dios que siempre andan por ahí, sea como sea, haciendo milagros...

~~~~~

*“THE BEAUTIFUL THING ABOUT LEARNING  
IS THAT NOBODY CAN TAKE AWAY FROM YOU”.*

*B. B. King*

## INDICE

Numero de página

|                                                          |            |
|----------------------------------------------------------|------------|
| <b>Indice</b> .....                                      | I, II, III |
| <b>Introducción General</b> .....                        | 1          |
| El modelo biológico: <i>Synbranchus marmoratus</i> ..... | 2          |
| <b>Objetivos</b> .....                                   | 6          |

### CAPITULO I

#### **CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS E HISTOLÓGICAS DE LAS GÓNADAS.**

##### **Introducción:**

|                                                 |    |
|-------------------------------------------------|----|
| El hermafroditismo en los peces teleósteos..... | 7  |
| La gónada masculina.....                        | 11 |
| Células de Sertoli vs. Células de Leydig.....   | 14 |
| El compartimiento intersticial.....             | 16 |
| El compartimiento germinal.....                 | 16 |
| El espermatozoide.....                          | 18 |
| Los conductos eferentes.....                    | 25 |

##### **Materiales y Métodos:**

|                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1- Lugares de muestreo.....                                                              | 27 |
| Técnicas de captura de los ejemplares.....                                               | 27 |
| 2- Transporte y mantenimiento de los animales.....                                       | 28 |
| 3- Procesamiento y obtención de las muestras. Caracteres morfométricos considerados..... | 29 |
| 4- Estudio anatómico e histológico de la gónada.....                                     | 30 |
| a- Anatomía.....                                                                         | 30 |
| b- Microscopía óptica.....                                                               | 30 |
| c- Composición de la población e I.G.S.....                                              | 31 |
| d- Microscopía Electrónica de transmisión (M.E.T.).....                                  | 31 |
| e- Microscopía Electrónica de barrido (M.E.B.).....                                      | 31 |

##### **Resultados:**

|                                                            |    |
|------------------------------------------------------------|----|
| Estudio anatómico e histológico de la gónada:              |    |
| El testículo del macho primario.....                       | 33 |
| La gónada de los revertantes.....                          | 34 |
| El testículo del macho secundario.....                     | 35 |
| Composición de la población y determinación del I.G.S..... | 36 |
| La espermatogénesis: aspecto óptico y electrónico:         |    |
| A) El compartimiento germinal.....                         | 37 |
| B) El compartimiento intersticial.....                     | 41 |

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| <b>Conclusiones y Discusión</b> ..... | 43 |
|---------------------------------------|----|

**CAPITULO II**  
**CICLO ANUAL DE LA ESPERMATOGÉNESIS.**

**Introducción:**

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| Los ciclos reproductivos.....                                             | 48 |
| El epitelio germinal.....                                                 | 50 |
| Regulación de la división celular.....                                    | 51 |
| Presencia de actividad 3 $\beta$ -HSD en células de Leydig y Sertoli..... | 54 |

**Materiales y Métodos:**

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>IIA)</b> Detección de la división celular.....                                | 58 |
| <b>IIB)</b> Localización de la enzima 3 $\beta$ -HSD en cortes de testículo..... | 60 |

**Resultados:**

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>IIA)</b> El Ciclo anual.....                                                  | 62 |
| <b>IIB)</b> Localización de la enzima 3 $\beta$ -HSD en cortes de testículo..... | 66 |

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| <b>Conclusiones y Discusión</b> ..... | 67 |
|---------------------------------------|----|

**CAPITULO III**  
**CARACTERIZACIÓN DE LAS VARIANTES MOLECULARES DE GnRH.**  
**INDUCCIÓN DE LA ESPERMIACIÓN.**

**Introducción:**

|                                                     |    |
|-----------------------------------------------------|----|
| La hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH)..... | 73 |
| La molécula de GnRH.....                            | 74 |
| Distribución taxonómica de GnRH.....                | 76 |
| GnRH en peces.....                                  | 79 |
| Inducción de la espermiación.....                   | 81 |
| Análogos de GnRH y antagonistas dopaminérgicos..... | 83 |

**Materiales y métodos:**

**IIIA) CARACTERIZACIÓN DE LAS VARIANTES ENDÓGENAS DE GnRH**

|                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------|----|
| 1) Obtención de cerebros. Extracción de los péptidos..... | 86 |
| 2) Cromatografía de alta presión (H.P.L.C.).....          | 87 |
| 3) Radio inmuno análisis.....                             | 87 |

**IIIB) INDUCCIÓN DE LA ESPERMIACIÓN**

|                                                          |    |
|----------------------------------------------------------|----|
| 1) Obtención y tratamiento previo de los ejemplares..... | 91 |
| 2) Monitoreo de la espermiación basal espontánea.....    | 91 |
| 3) Biopsias.....                                         | 92 |
| 4) Diseño experimental.....                              | 93 |
| 5) Dosaje de esteroides sexuales en sangre por RIA.....  | 97 |

**Resultados:**

|                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>IIIA)</b> Identificación de las variantes de GnRH en cerebro. Paralelismos..... | 99  |
| <b>IIIB)</b> Inducción de la espermiación.....                                     | 99  |
| Análisis histológico de las gónadas y biopsias.....                                | 101 |
| Dosaje de esteroides sexuales.....                                                 | 102 |
| <b>Conclusiones y Discusión</b> .....                                              | 104 |

|                                                                          |     |
|--------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Conclusiones generales</b> .....                                      | 108 |
| <b>Bibliografía</b>                                                      |     |
| Introducción general.....                                                | 111 |
| Capítulo I.....                                                          | 113 |
| Capítulo II.....                                                         | 121 |
| Capítulo III.....                                                        | 127 |
| <b>Publicaciones que han surgido del presente trabajo de tesis</b> ..... | 139 |

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Los peces, al igual que otras formas de vida, poseen un inmenso valor para la humanidad. Desde siempre, han formado parte de la dieta básica de muchos pueblos. Hoy en día, ellos conforman un elemento importante en la economía de muchas naciones así como brindan un incalculable valor recreacional a los naturalistas, a los entusiastas del deporte y a los acuaristas. Los peces también han sido parte de acuerdos y desacuerdos nacionales e internacionales. Muchas instituciones gubernamentales han invertido desde siempre en el estudio de su biología reproductiva y en las formas que éstos poseen para su propagación. Aspectos particulares han llevado estas investigaciones al terreno del comportamiento, la ecología, la evolución, la genética y la fisiología. Frecuentemente, han sido utilizados como indicadores o acumuladores de contaminación para proteger los ecosistemas y la salud de las poblaciones (Nelson, 1994).

Los peces constituyen, aproximadamente, algo más de la mitad del número total, de las 48.170 especies de vertebrados vivientes conocidas. Existen descripciones de unas 24.600 especies de peces, comparadas con los 23.550 de los tetrápodos (Kardong, 1998).

Actualmente, los peces óseos pueden dividirse en dos clases: los *Actinopterygii* y los *Sarcopterygii* (Figura 1a). El primero, abarca la mayoría de los peces óseos y ha sido el grupo más grande y predominante desde la era Paleozoica. El segundo, aunque más pequeño, es muy importante en relación con la historia de los vertebrados dado que originó a los tetrápodos y a sus descendientes. Dentro de los *Actinopterygii* una de las subdivisiones más aceptadas actualmente es la de *Chondrostei* y *Neopterygii*, los cuales se subdividen a su vez en otros taxa (Nelson, 1994).

Dentro de los *Neopterygii* es donde encontramos a los *Teleostei*, el cual está compuesto por más de 20.000 especies vivientes (Figura 1b). Ellos exhiben una amplia distribución geográfica y su historia data de 225 millones de años (Período Triásico). Aun así, éste parece ser un grupo monofilético originado en un ancestro común. En general, comparten ciertas características como ser la presencia de cola homocerca, escamas circulares, vértebras osificadas, vejiga natatoria y un cráneo con una compleja movilidad de la mandíbula que le permite la rápida captura del alimento (Kardong,





1998). Es notable, sin embargo la diversidad de sistemas reproductivos y patrones sexuales que este grupo posee (Sadovy y Shapiro, 1987).

Algunos de los grupos más familiares de teleósteos vivientes incluyen a los ordenes de los Clupeiformes (sardinias, anchoas), Salmoniformes (salmón, trucha), Perciformes (perca, corvina, palometa), Cypriniformes (carpa, dorado), Siluriformes (bagre), y los Atheriniformes (pejerrey, medaka), entre otros.

### **EL MODELO BIOLÓGICO: *Synbranchus marmoratus***

*Synbranchus marmoratus* Bloch, 1795, vulgarmente conocida como “anguila criolla”, “anguila de barro” o “pirá mboi”, es un pez teleósteo, perteneciente a la Familia Synbranchidae del Orden Synbranchiformes (Figura 2a) (Ringuelet y col., 1967). En este Orden se incluyen otros peces de aspecto anguiliforme, muy similares a la verdadera anguila (*Anguilla* sp.), pero de la cual los separa una considerable distancia taxonómica: el género *Anguilla* pertenece al Orden Anguiliformes, Superorden Elomorpha (Rosen y Greenwood, 1976).

El Orden Synbranchiformes comprende un grupo de peces con características anatómicas muy particulares: carecen de aletas pectorales y pélvicas y en su lugar poseen un pliegue tegumentario sin radios que en la mayoría de los casos confluye en una única formación dorso-caudo-ventral; ausencia o reducción casi total de las escamas en la mayoría de los géneros; el hueso cuadrado está articulado en dos sitios haciendo de éste uno de los pocos grupos de teleósteos con suspensión mandibular de tipo anfistilica (típica de Elasmobranquios primitivos y Crosopterigios). Además de la respiración branquial, poseen respiración aérea; los ojos son pequeños y algunas especies son funcionalmente ciegas. Las membranas branquiales están unidas, confluyendo en una pequeña abertura branquial o poro debajo de la cabeza; carecen de vejiga natatoria y costillas y poseen cuatro arcos aórticos completos. La mayoría son de tipo hermafrodita protogínico (ver Capítulo I). Todas estas características hacen de este grupo de teleósteos uno de los más altamente especializados en un gran número de aspectos (Lauder y Liem 1983).

La clasificación sistemática de los Synbranchiformes considerada en este trabajo corresponde a la adoptada por Nelson (1994). El Orden comprende 3 familias, 12 géneros y alrededor de 87 especies de las cuales 84 viven en agua dulce.

|                    |                                                   |
|--------------------|---------------------------------------------------|
| CLASE              | Actinopterygii                                    |
| SUBCLASE           | Neopterygii                                       |
| DIVISION           | Teleostei                                         |
| SUB DIVISIÓN       | Euteleostei                                       |
| SUPERORDEN         | Acanthopterygii                                   |
| SERIE              | Percomorpha                                       |
| <b>ORDEN</b>       | <b>Synbranchiformes (Synbranchii)</b>             |
| <b>SUBORDEN</b>    | <b>Synbrancoidei</b>                              |
| <b>FAMILIA</b>     | <b>Synbranchidae</b>                              |
| <b>SUB-FAMILIA</b> | <b>Synbranchinae (tres géneros)</b>               |
| <b>GÉNERO</b>      | → <i>Ophisternon</i> (6 sp)                       |
|                    | → <i>Monopterus</i> (15 sp)                       |
|                    | → <i>Synbranchus</i> (2 sp)(*)                    |
|                    | <b>ESPECIES: <i>Synbranchus marmoratus</i></b>    |
|                    | <i>Synbranchus madeira</i>                        |
| <b>SUB-FAMILIA</b> | <b>Macrotreminae (un solo género)</b>             |
| <b>GÉNERO</b>      | <i>Macrotrema</i> (1 especie)                     |
| <b>FAMILIA</b>     | <b>Chaudhuriidae (5 sp)</b>                       |
| <b>FAMILIA</b>     | <b>Mastacembelidae: 2 subflias, 4 gros, 57sps</b> |

(\*) Se determinaron 6 especies nuevas para el Amazonas. Prof. S. Favorito. Univ. Bandeirante, S. Paulo, Brasil. Com pers., 2000.

Los géneros que conforman la familia Synbranchidae, viven en agua dulce y ocasionalmente en estuarios. Se distribuyen ampliamente en toda la zona tropical y subtropical, Oeste de África, Liberia, Asia, Archipiélago Indo-Australiano, México y América Central y del Sur (Nelson, 1994).

Hubbs, en 1938, describió una especie cavernícola ciega, *Ophisternon infernalis*, confinada a la Península de Yucatán. En 1972, Rosen y Rumney describieron una segunda especie, *Synbranchus madeira*, endémica para el Sistema del Río Madeira (Bolivia). De la revisión sistemática hecha por Rosen y Greenwood en 1976, quedaron confirmadas para el nuevo mundo bajo el Orden Synbranchiformes: *Synbranchus*

A



B



C



*marmoratus*, *Synbranchus madeira*, *Ophisternon infernalis* y *Ophisternon aenigmaticum* (Cordero, 2000).

La distribución del género *Synbranchus* es muy amplia: desde el sur de México (Veracruz) hasta el sur de la Provincia de Buenos Aires. En Argentina, la especie *S. marmoratus* habita las cuencas de los ríos Paraguay, Paraná, Uruguay, Bermejo, Salado (Provincia de Buenos Aires), Río de La Plata y laguna Iberá (Bonetto, 1976; Fernández y Buti, 1996; Gómez y Chebez, 1996; Cione y Barla, 1997). Según Ringuelet y colaboradores (1967) sería el pez de mayor distribución en América del Sur.

Bonetto y Cordiviola de Yuan (1969) estudiaron varios cuerpos de agua temporarios del río Paraná durante la estación de las aguas bajas, observando la presencia de numerosas especies de peces adaptadas a estas condiciones entre ellas se encuentra la anguila criolla.

*S. marmoratus* es una especie nativa y típica de nuestros ambientes lóticos y lénticos de aguas tranquilas permanentes y transitorias como arroyos, lagunas, pantanos y esteros donde cumple su ciclo de vida completo (Cordiviola de Yuan y Pignalberi de Hassan, 1985). Es un pez de hábitos crepusculares, nocturnos y cavícolas: vive en cuevas que ella misma horada en las orillas de los cuerpos de agua donde habita (Figura 2c). Además de las características anteriormente mencionadas para el Orden Synbranchiformes, *S. marmoratus* posee narinas y ojos pequeños, de posición anterior (Figura 2b) y solo tiene aletas pectorales en etapa larval (Taylor, 1913). Aparte de la típica respiración branquial de los teleósteos, esta especie posee respiración intestinal (Baldisserotto y col., 1993) y bucofaringea muy desarrollada (facultativo), pudiendo permanecer fuera del agua durante varias horas (Figuras 8c y d) (Rosa 1977, Bicudo y Johansen, 1979; Sawaya y Piccolo, 1979; Graham, 1981, 1994; Graham y Baird, 1984; Munshi y Signh, 1968, Munshi y col., 1990; Thurston y Gehrke, 1993; Graham y col., 1987, 1995). La piel es muy gruesa y produce abundante mucosidad que recubre todo su cuerpo y la hace muy resistente a infecciones y a la vida en cautiverio.

Durante su etapa como juvenil, se alimenta de zooplancton, pequeños crustáceos (Cladocera y Ostracoda) e insectos asociados a la vegetación flotante (Rodríguez, 1999). En la etapa adulta, es carnívora, ingiere peces, moluscos (Pelecípoda y Gastropoda) y crustáceos (Olazarri, 1961; Marlier, 1967).

En muchas localidades del interior de nuestro país es utilizada para consumo humano dado que el peso del animal ya faenado corresponde a un 70% del total y

presenta varios aspectos homologables a la anguila europea y asiática, *Anguilla* sp., muy explotada y consumida en Europa y Asia.

En nuestro país en particular, existen grandes cuencas hidrográficas y cuerpos de agua asociados que alcanzan a cubrir extensas superficies con una abundante riqueza ictícola asociada tanto en aguas continentales como marinas (Ringuelet y col., 1967). Mucho se ha investigado en nuestro país sobre distintos aspectos de la biología de peces marinos y de agua dulce y hay vasta bibliografía disponible sobre taxonomía, ecología y anatomía. Sin embargo, respecto de la biología de la reproducción, hay poca información y debido a la gran diversidad es importante el estudio de los hábitos y características reproductivas de aquellas especies que, por su distribución geográfica, incidencia ecológica, contenido proteico u otras características, son de interés en el campo económico como producto de consumo (Colciencias-Inderena, 1985).

## OBJETIVOS

El propósito de la presente tesis doctoral fue conocer algunos aspectos de la biología reproductiva de los machos de *S. marmoratus* Bloch, 1795 (Teleostei, Synbranchiformes), dada la escasa información sobre el tema.

Para ello, se establecieron los siguientes objetivos dividiendo el trabajo en tres capítulos:

- 1) Caracterizar anatómica e histológicamente (a nivel óptico y electrónico) la gónada de los machos secundarios y de los revertantes. Verificar que en las zonas a muestrear en nuestro país, existen sólo machos secundarios. Describir cada uno de los estadios de la espermatogénesis (Capítulo I).
- 2) Estudiar los cambios cíclicos que presenta la gónada a lo largo del año y determinar el periodo de madurez sexual (ciclo reproductivo anual) (Capítulo II).
- 3) Identificar las variantes moleculares de las hormonas liberadoras de gonadotrofinas (GnRH) para permitir futuros estudios acerca de la función de las mismas en la reproducción de esta especie. Inducir artificialmente la liberación de gametas masculinas (espermiación) utilizando un análogo superactivo de GnRH y un antagonista dopaminérgico. (Capítulo III)

**CAPITULO I**

**CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS E  
HISTOLÓGICAS DE LAS GÓNADAS.**

## INTRODUCCIÓN

*"Would the battle of the sexes never have begun if humans had more fish like qualities?"*

### EL HERMAFRODITISMO EN LOS PECES TELEÓSTEOS

Se dice que una especie es hermafrodita si una proporción importante de los individuos de la población funciona con ambos sexos, ya sea simultáneamente o secuencialmente, en algún momento de su vida (Sadovy y Shapiro, 1987).

Tres aspectos de esta definición requieren comentario:

- 1) la definición se aplica a especie y no a individuos.
- 2) el énfasis se pone sobre la función reproductiva. La presencia de tejido gonadal no funcional de un tipo en individuos que poseen tejido funcional de otro tipo, no es criterio suficiente para designar a la especie como hermafrodita.
- 3) la definición específica que, los individuos que funcionan con ambos sexos, deben ser relativamente comunes en la población.

Existen también especies en las que algunos individuos pueden cambiar de sexo bajo determinadas condiciones ambientales, como polución, stress o temperatura (Jafri y Ensor, 1979; Warner, 1982). Purdom (1984) utiliza el término "hermafroditas normales y anormales", siendo estos últimos los no funcionales, mientras que Francis (1992) se refiere a "hermafroditas y hermafroditas rudimentarios".

En las especies hermafroditas se encuentran tres tipos de gónadas con características bien marcadas. La gónada "limitada" donde una membrana de tejido conectivo, separa el tejido femenino del masculino (Figura 3a). La gónada "no limitada tipo I" en la cual los tejidos femenino y masculino están en contacto uno con el otro, pero no se mezclan (Figura 3b). La gónada "no limitada tipo II", donde los tejidos femenino y masculino están entremezclados (Figura 3c).

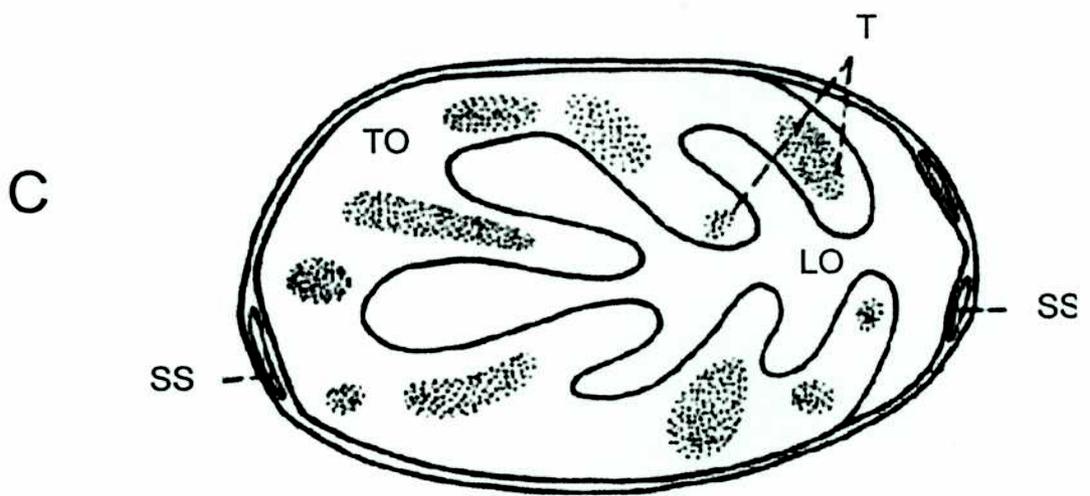
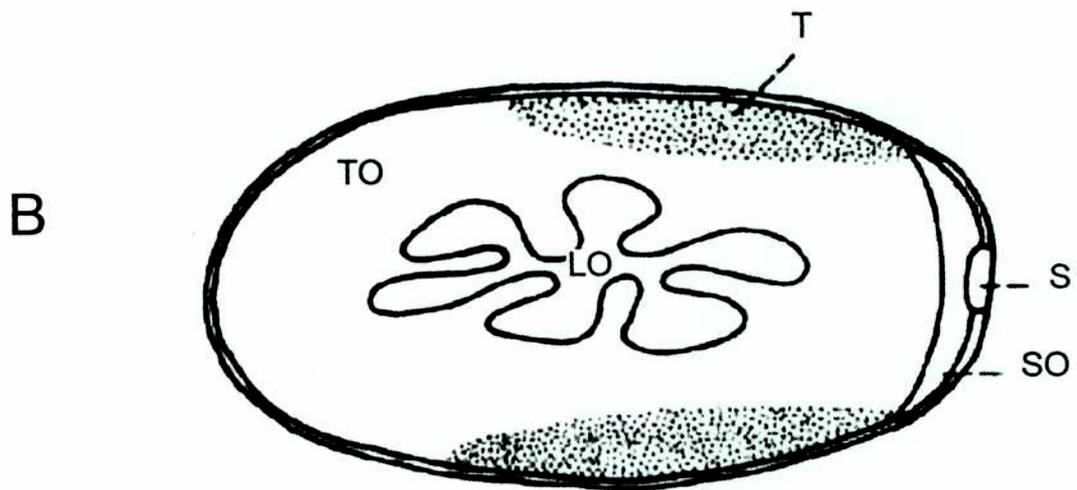
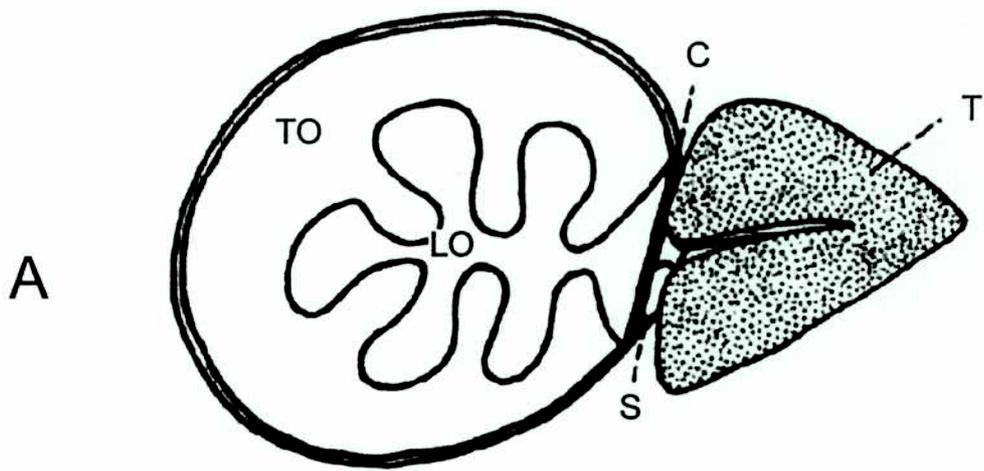
Existen dos formas básicas de hermafroditismo: A) Simultáneo y B) Secuencial o consecutivo.

**A) Hermafroditismo simultáneo:** los individuos funcionan con ambos sexos al mismo tiempo. Es poco común entre los teleósteos y está restringido a especies marinas frecuentadoras de arrecifes de coral (Reinboth, 1988).

Este tipo de hermafroditismo se puede diagnosticar teniendo en cuenta las siguientes características:

**Figura 3. Tipos de gónadas encontradas en las especies hermafroditas según Sadovy y Shapiro (1987). A) Gónada limitada. B) Gónada no limitada tipo I. C) Gónada no limitada tipo II.**

C: tejido conectivo; LO: luz ovárica; S: conducto espermático; SO: seno ovárico; SS: seno espermático; T: tejido testicular; TO: tejido ovárico.



- a) Las gónadas son limitadas o no limitadas tipo I.
- b) El tejido gonadal femenino y masculino está presente desde estadios tempranos del desarrollo gonadal. Pero debe existir tejido gonadal funcional de ambos sexos esto es, tejido ovárico con oocitos vitelogénicos, tejido espermático con espermátidas y/o espermatozoides y conductos eferentes bien definidos.
- c) Comprobación de la autofecundación.
- d) Debería conocerse que ambos tipos de tejidos funcionaran igual cantidad de tiempo durante la estación de reproducción y a través de la vida del individuo.

Ejemplos:

- Orden Cyprinodontiformes: Cyprinodontidae: *Rivulus marmoratus* (se autofecunda-y existen gonocóricos) (Harrington, 1971).
- Orden Perciformes: Serranidae. *Serranus fasciatus*, *S. tigrinus*, *S. baldwin* y *S. scriba* (Leonard, 1993). *S. cabrill* y *S. subligerius* (se autofecundan) (Hasting y Bortone, 1980), *Hepatus hepatus*, *Hypoplectrus nigricans* (Fisher, 1981) y *H. puella* (Ramírez, 1984).

**B) Hermafroditismo secuencial:** la gran diversidad de peces teleósteos presenta variados patrones de diferenciación sexual, por los cuales las gónadas se transforman en ovarios o testículos funcionales (Liem, 1963 y 1968). Una de las expresiones de plasticidad más importantes en el desarrollo, es la existencia de especies hermafroditas secuenciales en donde el cambio de sexo se presenta en alguna etapa de la vida (Lavett Smith, 1967; Francis, 1992). Aún en los teleósteos gonocóricos, hay una variación marcada en el modelo de determinación sexual y diferenciación (Reinboth, 1983; 1988). Yamamoto (1969) describió especies de peces gonocóricos, diferenciadas e indiferenciadas, basándose en la secuencia morfológica de la sexualidad y en la ocurrencia espontánea de reversión sexual e intersexos. La reversión natural del sexo, es decir, la maduración sucesiva de tejidos sexuales masculinos y femeninos en la historia de vida de los individuos, ocurre en varios teleósteos como un fenómeno espontáneo.

Para diagnosticar el hermafroditismo secuencial se utilizan dos parámetros: la distribución de la frecuencia de tamaños o edades y la proporción de sexos en los adultos (a través de estudios histológicos).

Existen dos tipos de hermafroditismo secuencial:

**1) Protandria:** algunos o todos los individuos de una población funcionan primero como machos y luego como hembras, esto no es frecuente entre los teleósteos. Hay dos modelos diferentes de desarrollo de hembras. En uno, las hembras se manifiestan como tales desde la larva y se las llama “hembras primarias”. En el segundo tipo las hembras se desarrollan a partir de machos funcionales, por reversión sexual de los mismos, y se las llama “hembras secundarias”. Las especies que poseen sólo hembras secundarias son llamadas “monogínicas” y las que poseen ambos tipos, “digínicas” (Sadovy y Shapiro, 1987).

En las especies con gónada “no limitada”, no se observa tejido testicular en los ovarios de las hembras totalmente transformadas.

En las especies con gónada “limitada” como por ejemplo los Spáridos, no hay tejido testicular o queda un vestigio unido al ovario.

Por lo tanto, la protandria no puede ser diagnosticada por la persistencia de características del sexo inicial, al final de la reversión.

Los parámetros tomados en cuenta para diagnosticar protandria son:

- a) Reconocimiento del tejido gonadal en individuos de distintos tamaños.
- b) Observación de tejido espermático en degeneración y ovárico en formación.
- c) Inducción experimental del cambio de sexo.

En a y b es fundamental encontrar individuos transicionales.

#### Ejemplos:

- Orden Stomiiformes: Gonostomidae. *Gonostoma elongatus* (Fisher, 1983).
- Orden Perciformes: Sparidae: *Sparus aurata* (Zohar y col., 1978), *Pagellus centrodonatus*, *P. acarne*, *P. mormyrus*, *Sargus sargus*, *Boops salpa* (gonocóricos) (Sellami y Bruslé, 1975) y *Rhabdosargus sarba* (limitada). Pomacentridae: *Amphiprion akallopisos*, *A. bicinctus* y *A. clarkii* (Moyer y Nakasono, 1978b).

**2) Protoginia:** algunos o todos los individuos de una población funcionan primero como hembras y luego como machos. Entre los teleósteos es muy frecuente. Hay dos modelos diferentes de desarrollo de machos. En uno, los machos desarrollan como tales desde la larva y se los denomina “machos primarios”. En el segundo tipo, los machos desarrollan a partir de hembras funcionales, por reversión sexual de las mismas, y se los llama machos “secundarios”. Las especies que poseen sólo machos secundarios son

llamadas “monándricas” y las que poseen ambos tipos de machos, “diándricas” (Reinboth, 1983, 1988; Sadovy y Shapiro., 1987). Es especialmente común en especies marinas de aguas templadas.

Chan y Phillips (1967) distinguieron dos tipos de machos (“cordón completo y medio cordón”) en las poblaciones de *Monopterus albus* (Zuiew) de las provincias de Kuantung y Hong Kong. Liem (1968) estudió ejemplares de *M. albus* de 11 a 73 cm. Los machos que medían, menos de 30 cm de longitud tenían invariablemente gónadas bilobulares sin evidencia de tejido ovárico u organización lamelar. Por lo que, es razonable asumir que ellos son machos primarios. Éstos fueron registrados en poblaciones de Tailandia, Sarawak (Borneo), Malasia y Okinawa. En los machos secundarios la organización lamelar de la gónada femenina es retenida dentro del testículo, el espermatozoide se desarrolla en la lamela ovárica primaria y la cavidad ovárica primaria persiste. Esto se encontró entre los individuos de mayor tamaño, que se originan de la reversión sexual de las hembras.

Liem (1968), distinguió machos primarios y secundarios en poblaciones de *S. marmoratus* de América Central y del Sur, pero no encontró machos primarios en Argentina, Cuba, Indias Occidentales e isla Perla (Panamá). Los machos primarios estuvieron ausentes en poblaciones de *M. albus* en Bandung, Java (Liem, 1963), el río Uda, Japón (Okada, 1966) y en Pehpei, China (Liu, 1944). Estas observaciones parecen indicar la existencia de diferentes razas geográficas en los Synbranchiformes, pero también es posible que los machos primarios no hayan sido muestreados y por ello, estuvieran ausentes en las colecciones.

Los machos secundarios de especies monándricas y diándricas presentan las siguientes características:

- a) Generalmente el tejido ovárico desaparece durante o posteriormente a la reversión del sexo, pero mantienen la cavidad ovárica primaria por lo cual, la luz ovárica es una fuerte evidencia de reversión sexual.
- b) Los conductos espermáticos se desarrollan en grietas de las capas musculares de la cápsula ovárica y corren a lo largo de la pared gonadal, constituyendo un buen criterio para demostrar la reversión sexual.

### Ejemplos:

- Orden Perciformes: Sparidae (Hecht y Baird, 1977): *Pagellus erythrimus* (gonocóricos), *Spondyliosoma cantharus*, *Dentex tumifrons* (gonocóricos).
- Serranidae (Hasting, 1981; Shapiro, 1981a): *Alphes* sp., *Petrometropon* sp., *Epinephelus* sp., *Mycteroperca* sp., *Cephalopholus* sp., *Serranus* sp., *Hipolectodus maccullochi*, *Plectropomus leopardus* (Ferreira, 1995).
- Anthiidae: *Anthias squamipinis* (Shapiro, 1981c).
- Labridae (Ross y col., 1983): *Labrus tardus* (gonocóricos), *L. merula*, *L. ossifagus* (Lonnberg y Gustafson, 1937), *Labroides dimidiatus*, *Coris giofredi* y *C. julis* (Reinboth, 1962) *Hemipteronotus* sp., y *Halichoeres poecilopterus* (Okada, 1964), *Thalassoma bifasciatum* (Bloch) y *T. pavo* (Reinboth, 1962).
- Gobidae (Cole, 1983; Cole y Robertson, 1988; Ross y col., 1983): *Gobiosoma multifasciatum*, *Priolepis hipoliti*, *Coryphopterus nicholsi*, *Coryphopterus personatus* (monándrica).
- Scaridae (Robertson y Warner, 1978): *Sparisoma aurofrenatum*.
- Pomacanthidae (Sakai, 1996; Sakai y Kohda, 1997): *Centropyge interruptus*, *C. bicolor*, *C. tibicen*, *C. resplendens* y *C. ferrugatus*.
- Orden Synbranchiformes: *Monopterus albus* (Chan y Phillips, 1967), *Synbranchus bengalensis* (M'Clelland), *Synbranchus marmoratus* (B.) y *Typhlosynbranchus boueti* (Pellegrin) (Liem, 1968).

Como hemos visto, los peces teleósteos exhiben varios patrones sexuales durante su ontogenia, en donde las gónadas se transforman en ovarios o testículos funcionales. La expresión más remarcable de plasticidad en el desarrollo sexual es el cambio de sexo, el cual les ha brindado una importante ventaja adaptativa. Dado que éstos procesos son regulados por factores genéticos y fisiológicos así como ambientales, es muy interesante no sólo conocer los mecanismos de diferenciación sexual sino, aplicar dichos conocimientos en el control del sexo como parte de programas de investigación y acuicultura intensiva (Pandian y Sheela, 1995).

### **LA GÓNADA MASCULINA**

Los testículos de los vertebrados en general son órganos pares, pero hay especies donde puede ser impar. Esto se debe a la fusión temprana de los mismos durante el desarrollo o a la degeneración unilateral de uno de ellos. Están ubicados en la región

dorsal de la cavidad del cuerpo, a ambos lados de la línea media y unidos a la pared dorsal de la cavidad abdominal por el mesorquio.

La literatura perteneciente a la estructura y función de los testículos en teleósteos ha sido revisada por numerosos investigadores: Hoar (1969); Dood (1972); Lofts y Bern (1972); Guraya (1976b); Callard y col. (1978). Sin embargo estos trabajos individual o colectivamente no lograron resolver las inconsistencias respecto de la morfología y de la homología entre los diferentes tipos celulares.

El testículo se describe como una estructura más variable que la observada en mamíferos, pudiendo ser lobular o tubular (Dood, 1972; de Vlaming, 1974; Callard y col. 1978), pero en ningún caso se establecieron los criterios para distinguir un tipo del otro. Los términos “lóbulo y túbulo” han sido utilizados alternativamente sin establecer su distinción (Sanwal y Khanna, 1972; Shresta y Khanna, 1978; Leatherland y Sonstergard, 1978). En trabajos posteriores se definieron las características de los distintos tipos de testículo (Grier, 1981; Grier y Abraham, 1983; Grier y col. 1987; Grier, 1993). Sin embargo aún hoy no es frecuente encontrar descripciones que se ajusten a la nueva clasificación o que indiquen el tipo de testículo al cual se refieren (Legendre y col., 1996; Pecio y Rafiniski, 1994).

El testículo de los peces teleósteos está envuelto por una capa de tejido conectivo, llamada “cápsula testicular” (Billard, 1986). Presenta un compartimiento “intersticial” y uno “germinal”. El primero se encuentra constituido por células intersticiales o de Leydig, mioides, vasos sanguíneos y linfáticos. El segundo está representado por el epitelio germinal, que consiste en una membrana basal (que lo separa del intersticial), células germinales y de Sertoli. Estos tres elementos forman la unidad funcional del testículo que es el “espermatozoido”. Así, los testículos se clasifican en base a las características del compartimiento germinal (Grier, 1993) en:

**a)** lobulares restringidos (Figura 4a), **b)** lobulares irrestringidos (Figura 4b) y **c)** tubulares anastomosados (Figura 4e).

Los testículos lobulares están constituidos por numerosas protuberancias de forma redondeada, sólidas, separadas por fisuras de tejido intersticial. Éstas protuberancias se disponen radialmente y terminan ciegas por debajo de la superficie del testículo, es decir que se apoyan en la cápsula testicular y su extremo opuesto se abre en el canal testicular o en el conducto eferente. La disposición de los espermatozoides dentro del lóbulo permite diferenciar a los testículos irrestringidos de los restringidos.

**Figura 4.**

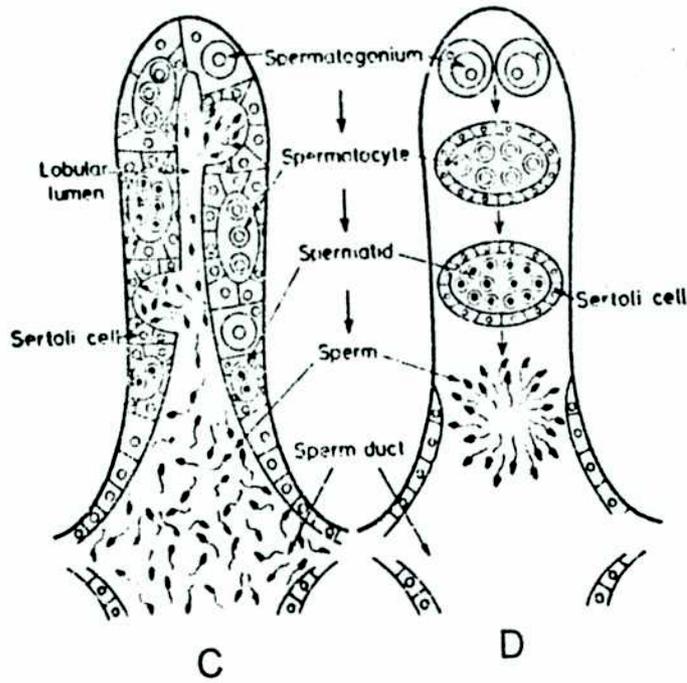
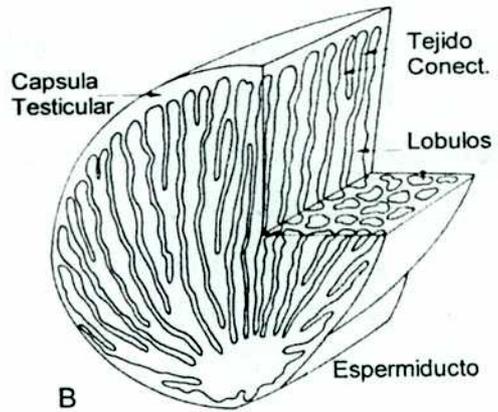
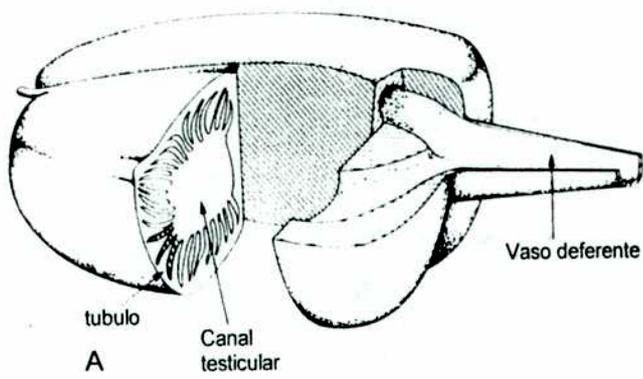
**A)** Esquema general de un testículo de tipo lobular restringido (adaptado de Billard, 1986).

**B)** Esquema general de un testículo de tipo lobular irrestringido (adaptado de Billard, 1986).

**C)** Representación de los elementos germinales dentro de un lóbulo (lobular irrestringido) (tomado de Nagahama, 1983). **D)** Representación de los elementos germinales dentro de un lóbulo (lobular restringido) (tomado de Nagahama, 1983). *Spermatogonium*: espermatogonias; *Spermatocyte*: espermatocitos; *Spermatid*: espermátidas; *Sperm*: espermia; *Sperm Duct*: conducto espermático; *Sertoli cell*: célula de Sertoli; *Lobular lumen*: luz del lóbulo.

**E)** Testículo tubular anastomosado (tomado de Grier, 1993).

DP: conducto eferente; i: tejido intersticial; TA: túbulos anastomosados; punta de flecha: periferia del testículo.



a) Dentro de cada lóbulo encontramos los distintos estadios de la espermatogénesis ordenados en forma creciente de maduración desde el extremo ciego hacia el centro del testículo, donde el lóbulo se abre en el canal testicular. Las espermatogonias A o células madre, cada una de ellas rodeada por procesos de las células de Sertoli, se concentran en el extremo ciego del lóbulo. A continuación se ubican las espermatogonias B, luego los espermatocitos I y así continúa el ordenamiento hasta que finalmente en el extremo opuesto del lóbulo se encuentran los espermatozoides. A partir de espermatogonia B, cada uno de los estadios está contenido dentro de espermatocitos, los cuales progresan hacia el centro del testículo a medida que la espermatogénesis avanza (Figura 4a y 4d). Los espermatozoides están agrupados en estructuras llamadas espermatozuegnas (sin cápsula) o espermatóforos (con cápsula).

Ej: Atherinomorpha (Grier, 1981): Atheriniformes: Phallotestidae; Atherinidae: *Menidia beryllina*, *Labidesthes sicculus*. Cyprinodontiformes: Fundulididae: *Fundulus grandis*, *F. heteroclitus*. Godeidae: *Xenotoca eiseni*. Poeciliidae: *Poecilia latipinna* (molly), *P. reticulata* (guppy). Hemirhamphidae: *Nomorhamphus* sp., *Dermogenys* sp., *Hemirhamphodon* sp., *Zenachorterus* sp. (Downing y Burns, 1995). Characiformes: Glandulocaudinae: *Mimagoniatus barberi* (Burns y col., 1995).

b) Existe en la mayor parte de los peces teleosteos. Los lóbulos presentan espermatocitos, cada uno de ellos conteniendo uno de los estadios de la espermatogénesis, pero no guardan un orden como en los restringidos. Es decir que a cualquier altura del lóbulo se puede encontrar cualquier estadio de la espermatogénesis. Éstos lóbulos solo presentan luz cuando los espermatocitos se rompen para liberar los espermatozoides y en la etapa posterior a ésta, hasta que el testículo reinicia la etapa de proliferación de la espermatogénesis (Figura 4b y 4c).

Ej.: Cypriniformes, Salmoniformes, Perciformes: *Centropomus undecimalis*, *Oreocromis* sp., *Scianops ocellatus* (Grier, 1981 y 1993).

c) Los lóbulos en lugar de tener una disposición radial, forman anastomosis y por lo tanto, el testículo tiene un aspecto muy irregular. La cápsula testicular está más desarrollada que en los lobulares. Los espermatocitos se ubican como en los lobulares irrestringidos (Figura 4c y 4e).

Ej.: Siluriformes: *Ictalurus natalis*; Clupeiformes: *Opisthonema oglinum*, *Cuplea*

*arengus* (arenque), *Prochilodus acculeatus* (sábalo); Esociformes: *Esox niger* (Grier, 1993).

### CÉLULAS DE SERTOLI vs. CÉLULAS DE LEYDIG

Durante los últimos 40 años, se han realizado numerosos estudios del tejido intersticial usando microscopía óptica y electrónica en varias especies de teleósteos (Billard y col., 1982; Nagahama, 1986; Dodd y Sumpter, 1984; Grier, 1993). El propósito de los mismos ha sido resolver el conflicto desarrollado por Marshall y Loft (1956) quienes propusieron que en el testículo de *Esox lucius* (lucio), *Salvelinus willunghbii* (trucha de escamas pequeñas), y de *Labeo* sp., las células homólogas a las de Leydig estaban distribuidas en las paredes de los túbulos como células “limitantes del lóbulo”. Según ellos, las células no se originaban en la zona intersticial, sino dentro de las paredes del lóbulo, y se teñían positivamente para lípidos y colesterol. Consideraron que estas células limitantes del lóbulo eran homólogas a las de Leydig de los mamíferos. A la misma conclusión llegaron, Ahsan (1966) trabajando con *Couesius plumbeus*, O'Halloran e Idler (1970) con *Salmo salar* (salmón del Atlántico) y Upadhayay y Guraya (1971). Esta similitud puede ser aceptada desde un punto de vista anatómico, pero la homología funcional de estas células con las de Leydig, es dudosa. La presencia de lípidos colesterol positivos no es un criterio suficiente para la identificación de células productoras de esteroides. De acuerdo con Marshall y Lofts (1956), las células limitantes del lóbulo están presentes en los testículos que no poseen células intersticiales típicas. Esta controversia fue principalmente debida a la baja resolución de las técnicas histoquímicas realizadas y al hecho que, en ciertos teleósteos, las células de Sertoli, poseen gotas de lípidos, mientras que éstas pueden estar ausentes en las células de Leydig (Grier y col., 1989).

Estudios de microscopía electrónica indicaron claramente que en algunas especies de teleósteos los testículos presentaban ambos tipos de células, intersticiales y “limitantes del lóbulo” (Guraya, 1976b; Nagahama y col., 1982). En las especies de teleósteos estudiadas posteriormente, mediante técnicas histoquímicas, de microscopía electrónica (Van der Hurk y col., 1978; Grier, 1981; Grier y col., 1989; Nagahama, 1986) e *in vitro* (Loir, 1990a y b) se demostró claramente la presencia de células de Leydig en el tejido intersticial y se confirmó que éstas células son la fuente principal de los esteroides gonadales.

En *Porichthys notatus* (Stanley y col., 1965), *Poecilia reticulata* (Billard, 1970b), *Cichlasoma nigrofasciatum* (Nicholls y Graham, 1972), *Oryzias latipes* (Gresik y col., 1973b; Gresik, 1975), *Poecilia latipinna* (Grier, 1975), *Oryzias latipes* (Grier, 1976), *Oncorhynchus kisutch*, *O. gorbuscha* (Nagahama y col., 1978) y (Hoar y Nagahama, 1978), las células “limitantes del lóbulo” fueron consideradas más exactamente como homólogas a las células de Sertoli. En estas especies, estas células están separadas del espacio interlobular por una membrana basal delgada y se encuentran en estrecha proximidad con las espermatidas y el espermatozoide en desarrollo. Poseen algunos aspectos ultraestructurales que sugieren la actividad fagocítica de cuerpos residuales y células germinales en degeneración, además de una participación en el transporte de metabolitos (Billard y Jalabert, 1972). De acuerdo con los estudios de Grier (1993), las células de Sertoli tiene función fagocítica en todos los taxa de cordados y divide a este proceso en dos categorías: a) fagocitosis de células germinales residuales incluyendo a los espermatozoides residuales, posteriormente a la estación reproductiva (en los ponedores estacionales) y b) fagocitosis de cuerpos residuales.

Grier y Linton (1977) usando técnicas de microscopia electrónica e histoquímicas, reinvestigaron los testículos del *Lesox lucius* (lucio del norte) y encontraron que el material sudanofílico estaba ubicado en las células homólogas a las de Sertoli, las cuales yacen dentro de la membrana basal. Por lo tanto ellas no podrían ser identificadas como las células intersticiales de Leydig, aunque la organización celular de los testículos del lucio puede ser atípica entre los teleósteos. En conclusión, el término “células limitantes del lóbulo” (con el rol esteroideogénico implicado) para las células somáticas intralobulares es poco preciso, ya que no se justifica sobre una base funcional. La terminología alternativa usada como “célula cistal” (Roosen-Runge, 1977; Billard y col., 1982) o, más recientemente, célula de Sertoli (Grier, 1993) es más exacta.

En general, en las células de Sertoli se observó ultraestructuralmente que las vesículas del retículo liso están menos desarrolladas que en las células de Leydig y que la presencia de crestas mitocondriales fue variable. En dichas células se observó un aparato de Golgi desarrollado y conjuntos de gránulos de glucógeno, lo que permite sugerir que las células de Sertoli son menos activas en la esteroideogénesis. El glucógeno puede estar indicando una función nutritiva ya que está ubicado en el citoplasma de las células que rodean a los espermatozoides en la espermatoogénesis (Yeung y col., 1985).

En los testículos de *Oncorhynchus rhodurus* (salmón amago), las células de Sertoli se hipertrofian hacia el final de la espermiación.

## EL COMPARTIMIENTO INTERSTICIAL

El tejido intersticial presenta fibroblastos, células mioides, células de Leydig y vasos sanguíneos (Cauty y Loir, 1995). Las células intersticiales o de Leydig, están distribuidas aisladamente o en grupos pequeños entre los lóbulos testiculares de los teleósteos. En *Poecilia latipinna*, se ubican alrededor de los conductos eferentes y en la periferia del testículo pero no entre los lóbulos testiculares (Van den Hurk, 1973; Van den Hurk y col., 1974).

Las observaciones al microscopio electrónico han mostrado que las células intersticiales testiculares de los teleósteos tienen un aspecto típico de células productoras de esteroides ej. *Poecilia reticulata* (guppy) (Follenius y Porte, 1960); *Gasterosteus aculeatus*, (Follenuis, 1968); *Oncorhynchus mykiss* (trucha arco iris) (Oota y Yamamoto, 1966); *Cichlasoma nigrofasciatum* (Nichols y Graham, 1972); *Orizyas* sp. (medaka), *Gobius* sp., *Poecilia* sp. (black molly), *Oncorhynchus* (salmón del Pacífico)(Nagahama y col., 1978); *Anguilla japonica* (Sugimoto y Takahashi, 1979). Éstas son células poligonales, caracterizadas por un amplio retículo endoplasmático agranular y mitocondrias con crestas de tipo tubular. En *Oryzia* sp. (medaka), las células intersticiales aparecen antes de la diferenciación de las espermatogonias (Yosikawa y Oguri, 1979). En *Cichlasoma nigrofasciatum*, se hallaron evidencias del origen intersticial de las células de Leydig a partir de elementos del tejido conectivo de tipo fibroblástico (Nicholls y Graham, 1972).

## EL COMPARTIMIENTO GERMINAL

Como se indicara anteriormente, está constituido por las células de Sertoli y las células germinales, las cuales se apoyan sobre una membrana basal. Estos tres elementos forman los **espermatoquistos**, en los cuales se desarrolla la espermatogénesis.

En los peces teleósteos el proceso de espermatogénesis, involucrado en la formación de los espermatozoides es extremadamente diverso. Se lleva a cabo en dos fases: la proliferativa, consistente en la renovación de las células madre por mitosis y la fase de meiosis y diferenciación (espermiogénesis) la cual provee una célula móvil especializada en fecundar al oocito (Schulz y col., 2000). La espermatogénesis es abastecida por células indiferenciadas provistas por la propia renovación de las células

madre o **espermatogonias** primarias (De Rooij y Grootegoed, 1998). La renovación de las espermatogonias primarias (ó **A**) involucra una mitosis regular, mientras que la que dará origen a las espermatogonias secundarias (ó **B**) se caracteriza por una incompleta citoquinesis dejando puentes citoplasmáticos que conectan a los descendientes de una célula madre dada hasta la espermiación (Schulz y col., 2000). Las células germinales de la misma cohorte comienzan el desarrollo sincrónicamente. Todos los miembros de una cohorte dada están agrupados en un mismo espermatocisto, formado por un número de células de Sertoli. Durante estas divisiones las células de Sertoli también proliferan. En el tiburón *Squalus acanthias* (Callard y col., 1989), encontraron 64 espermatidas por célula de Sertoli; en el guppy 172 espermatidas por célula de Sertoli (Billard y col., 1969a).

Muchas de las células de Sertoli encontradas en la fase S, estaban asociadas con espermatogonias tempranas o tardías, unas pocas con **espermatoцитos I** tempranos y ninguna con espermatoцитos en paquitene. Estas conclusiones indican que la proliferación de las células de Sertoli cesa cuando el espermatocisto se aproxima al número de células germinales predecible. Se especula que la regulación de la proliferación de las células de Sertoli en peces está funcionalmente relacionada con la de la espermatogénesis (Schulz y col., 2000). Aparentemente las células de Sertoli están asociadas con un número específico y finito de células germinales. En los peces proliferan durante la espermatogénesis y pueden constituir otra población de células madre. El soporte estructural y funcional de las células de Sertoli sobre las germinales es de importancia para la espermatogénesis. La supervivencia de las células germinales depende estrictamente de la presencia y función fisiológica de las de Sertoli. La ausencia de contacto célula de Sertoli- germinal, en aquellas células germinales ubicadas centralmente en grandes espermatocistos, pueden indicar que en anamniotas las células de Sertoli envían señales a través de factores difusibles o que los puentes citoplasmáticos que conectan a las células de la misma cohorte sirven para propagar las señales enviadas desde las células de Sertoli ubicadas periféricamente.

Las espermatogonias secundarias sufren un número específico de divisiones mitóticas antes de entrar en meiosis. En el guppy se reportaron 14 divisiones (Billard, 1969a), en la anguila japonesa (*Anguila japonica*), 10 divisiones (Miura y col., 1991a). Debido al tipo cístico de la espermatogénesis, las generaciones consecutivas de espermatogonias no son fácilmente identificables. La última generación emerge de la mitosis final como espermatoцитo I preleptoténico. La profase de la primera división

meiótica es larguísima. Terminada la primera división se originan los **espermátocitos II** de corta vida. Estas células rápidamente progresan a través de la segunda división del ciclo, reduciendo la fase S, de la cual ellos emergen como **espermátidas** redondas. Hay una reestructuración celular por la cual la espermátida se diferencia en espermatozoide. Esto involucra empaquetamiento de la cromatina altamente condensada en la cabeza del espermatozoide y la formación del flagelo. Mientras este proceso depende de la expresión de numerosos genes, el genoma se vuelve inaccesible progresivamente, debido a la condensación de la cromatina. Más aún, no todos los genes necesarios para la espermiogénesis están disponibles en todas las células. Los transcritos necesarios durante la espermiogénesis tardía son producidos precozmente, cuando el genoma es aún accesible y luego son secuestrados por proteínas de unión a mRNA hasta su uso posterior (transcritos de protaminas) (Braun y col., 1989)(Romagoza y col., 2000).

## **EL ESPERMATOZOIDE**

En los animales, se han definido dos tipos de espermatozoides de acuerdo con el modo de transmisión y fecundación (Jamieson y col., 1995). El llamado “espermatozoide acuático” (Baccetti, 1979) o “acuaesperma” (Jamieson, 1986a, b) que es liberado en el medio acuático y donde la fecundación es externa y el “intraesperma” (Rouse y Jamieson, 1987) que no es liberado en el medio acuático, se encuentra en los animales con fecundación interna y puede ser acrosomal o anacrosomal.

En los peces teleósteos se encuentran los dos tipos, el acuaesperma y el intraesperma el cual en general es anacrosomal. Pero en *Salmo gairdneri* (Billard, 1983b) y en *Neoceratias spinifer* (Lophiiformes) (Jespersen, 1984), si bien el espermatozoide no posee acrosoma hay una aparición transitoria en la espermátida; en *Lepadogaster lepadogaster* (Perciformes, Gobiesocidae) (Mattei, 1978b) hay un posible vestigio en el espermatozoide maduro y en *Lepidogalaxias salamandroides* (Osmeriformes) (Pusey y Stewart, 1989) se encuentra una estructura semejante a un acrosoma. En el género *Melanotaenia* (Atheriniformes) se observa una vesícula anterior, y las vesículas encontradas en *Sternarchus albifrons* (Gymnotiformes, Gymnotodidae) y en *Lates calcarifer* (Perciformes, Centropomidae) son posiblemente homólogas a un acrosoma, como puede serlo la vesícula incluida en la región anterior de la célula de Sertoli en *Gambusia affinis* (Cyprinodontiformes) (Jamieson, 1991).

La morfología de los espermatozoides muestra diversos grados de complejidad dependiendo de las especies. El estudio ultraestructural de la espermiogénesis y el

espermatozoide en peces teleósteos ha sido revisado por Mattei (1969, 1970) para peces marinos y por Billard (1970b) para peces de agua dulce. Posteriormente Jamieson (1991) publicó una revisión sobre la ultraestructura de los espermatozoides de los peces, relacionada con la sistemática y la evolución y Mattei (1991) sobre ultraestructura y sistemática.

Según la clasificación de Mattei (1991), en los teleósteos encontramos dos tipos de acuaesperma, el "tipo I y el tipo II". El tipo I se caracteriza por poseer cabeza redondeada de 2-3  $\mu\text{m}$  de diámetro, sin acrosoma, dos centriolos cada uno con nueve tripletes de microtúbulos ubicados en la región distal del núcleo. El centriolo proximal frecuentemente forma ángulo recto con el distal, y éste dará origen al flagelo. Uno o ambos centriolos, pueden o no estar localizados en la fosa basal del núcleo, si como es frecuente, una fosa está presente. Las mitocondrias tienen crestas pequeñas, están presentes alrededor de los centriolos, generalmente se ubican formando un collar citoplasmático el cual se extiende alrededor de la base del flagelo y están separadas de éste por un espacio periaxonemal, llamado canal citoplasmático. La región que contiene las mitocondrias forma la pieza media, la cual no está bien demarcada y no excede de 1  $\mu\text{m}$  de longitud. El flagelo contiene un axonema de la clásica forma 9+2 microtúbulos, la membrana citoplasmática que lo cubre puede formar 1, 2 ó 3 procesos longitudinales, llamados aletas. En el espermatozoide joven, el diplosoma está cerca de la membrana plasmática, a la cual el futuro centriolo distal está unido, éste dará origen al flagelo, mientras el diplosoma se mueve hacia la base presuntiva del núcleo. Como el centriolo está unido a la membrana, ésta se hunde para formar el canal citoplasmático. Luego una rotación, hace que el flagelo se vuelva perpendicular a la base del núcleo con su eje longitudinal coincidiendo con el de éste (Mattei, 1970 y 1988).

El espermatozoide tipo II se caracteriza por la falta de la rotación del eje del flagelo respecto del núcleo. El flagelo permanece paralelo a la base del núcleo. Aunque es frecuente encontrar una fosa nuclear, los centriolos permanecen fuera de ella (Mattei, 1970 y 1988). El canal citoplasmático puede estar ausente si la pieza media es muy pequeña (ej. *Maccullochella*). En el axonema los túbulos A de los dobletes 1 2 5 y 6 exhiben diferenciación intratubular, la luz aparece densa. Este tipo de espermatozoide se encuentra en los teleósteos más evolucionados, los Acanthopterygii y sólo entre los Perciformes, 25 familias de las 39 estudiadas, lo poseen (Mattei y col., 1979; Mattei, 1988).

La forma y tamaño de la cabeza están asociados con los del núcleo. La forma elongada se relaciona con la fecundación interna (Kweon y col., 1998), mientras que la esférica con la fecundación externa (Burns y col., 1998). El tamaño de los núcleos es variable, en *Lampanyctus* sp., 6µm (Myctophiformes) (Mattei y Mattei, 1976); en *Pantodon buchholzi*, 7µm (Osteoglossiformes) (Van Deurs y Lastein, 1973); en *Lepidogalaxias salamandroides*, 20µm (Osmeriformes) (Leung, 1988) y en *Lepadogaster lepadogaster* (Osmeriformes, Gobiesocidae) (Mattei, 1978b); en *Ophidion*, 8µm (Ophidiiformes) y es apicalmente helicoidal (Mattei y col. 1989) y en *Neoceratias spinifer*, 11µm (Lophiiformes) (Jespersen, 1984).

En Poeciliidae (Cyprinodontiformes) (Billard, 1970b; Grier, 1975) y en *Hemirhamphodon pogonognathus* (Perciformes, Hemiramphidae) (Jamieson, 1989) el núcleo es elongado y con forma de espada. En *Anarhichas lupus* (Perciformes) la cabeza es elongada (posee fecundación interna) (Pavlov y col., 1997). En *Oncorhynchus mykiss* (Salmoniformes) la cabeza es ligeramente elongada (Billard, 1983a).

En los Siluriformes la estructura de las gametas es altamente diversificada. La forma de la cabeza, en las familias Auchenipteridae y Ageneiosidae, es elongada (Loir y col., 1989), en *Clarias senegalensis* ligeramente elongada (Mattei, 1970) y en *Tatia brunea* es débilmente helicoidal (Mattei, 1970). En muchas de las otras familias conocidas, la cabeza es esférica: *Silurus glanis*, *Pseudobagrus fulvidraco*, *Liocassus ussuransis*, y *Ameirus nebulosus* (Emel'yanova y Makeyeva, 1992), *Rhamdia sapo* (Maggese y col., 1984) e *Ictalurus punctatus* (Emel'yanova y Makeyeva, 1991).

En el guppy (Cyprinodontiformes) la cabeza es elongada (Billard, 1970a); en *Anguilla anguilla* (Anguilliformes) la cabeza es elongada y en el extremo anterior del núcleo se encuentra una mitocondria (Billard y Ginsburg, 1973; Çolak y Yamamoto, 1974; Todd, 1976). En la carpa (Cypriniformes) y el pike (Esociformes) (Billard, 1969a) la cabeza es esférica.

El núcleo presenta una fosa basal profunda en *Zeus* (Zeiformes); en *Dactylopterus*, (= *Cephalocanthus*) (Scorpaeniformes, Dactylopteridae); en Clupeiformes; en *Pegusa triophthalmus* (Pleuronectiformes); en los Tetradontiformes, *Balistes forcipatus*, *Pseudobalistes fuscus* (Balistidae), *Aluterus punctatus* (Monacanthidae) y *Chilomycterus antennatus* (Diodontidae); en *Scorpaena angolensis* (Scorpaeniformes); en *Upeneus prayensis* (Perciformes) y en los Goodeidae (Cyprinodontiformes) (Mattei, 1970).

La capa de cromatina es particularmente delgada en una o más regiones del núcleo en *Dactylopterus* (Scorpaeniformes) (Boisson y col., 1968a) y en los Perciformes, Gobiidae y Eleotridae *Hypseleotris galii* (Jamieson, 1991). El núcleo es puntiagudo o con forma de espada, con una fosa ventral en *Oligocotus maculosus* (Scorpaeniformes) (Stanley, 1969); en *Cymatogaster aggregata* (Perciformes, Embiotocidae) (Gardiner, 1978b); en los Cyprinodontiformes, *Jenynsia lineata* (Dadone y Narbaitz, 1967) y Poeciliidae (Russo y Pisanó, 1973; Grier, 1975); los cuales son de fecundación interna aunque el significado funcional de la fosa en estas formas tan diversas es desconocido. El espermatozoide de Elopomorpha, exceptuando a los Muraenidae, tiene un núcleo en forma de medialuna (Mattei y Mattei, 1974).

La **pieza media** forma un anillo o un cuerpo simple en forma de "C" en los Salmonoidei (Salmoniformes); en los Argentinoidea y Galaxioidea (Osmeriformes); en los Engraulidae (Clupeiformes) y en *Macquaria ambigua* (Perciformes, Percichthyidae) (Jamieson, 1991). En *Anarhichas lupus* (Perciformes) la pieza media está desarrollada y tiene fecundación interna (Pavlov y col. 1997). En *Oncorhynchus mykiss* (Salmoniformes) (Billard, 1983a) la pieza media está reducida a una mitocondria en forma de anillo. En la carpa (Cypriniformes) y el pike (Esociformes) (Billard, 1969a) la pieza media está reducida. Hay una mitocondria simple y elongada abierta a lo largo de un lado en *Jenynsia* y en el guppy (Cyprinodontiformes) la pieza media está muy desarrollada (Billard, 1970a) Una mitocondria simple, compacta, unilateral se encuentra en *Trachinocephalus* sp. (Aulopiformes); en los Perciformes, *Maccullochella* (ocasionalmente 2 en *M. peeli*) (Leung, 1987a) y *Hypseleotris galii* (Eleotridae) (Jamieson, 1991). En los Congridae (Anguilliformes) (Mattei y Mattei, 1974) los espermatozoides tienen una simple mitocondria en una concavidad nuclear no basal. La pieza media tal vez alcanza su máxima longitud en el *Pantodon*, 45  $\mu\text{m}$ . (Osteoglossiformes) (Van Deurs y Lastein, 1973) En Salmónidos se caracteriza por poseer un cuerpo osmiófilo en el extremo del canal citoplasmático. En Elopomorpha la mitocondria (usualmente simple) está desplazada a lo largo del núcleo hasta la punta. Varias mitocondrias también están localizadas en la punta en *Blennius pholis* (Perciformes) a diferencia de sus congéneres los cuales tienen mitocondrias postnucleares (Jamieson, 1991).

El ordenamiento de las mitocondrias en las piezas medias elongadas es muy variable taxonómicamente. Contrastando con el cilindro abierto en *Jenynsia* sp. (Cyprinodontiformes) (Dadone y Narbaitz, 1967), aquellas de los Poeciliidae, se ubican

en dos a cinco columnas alrededor del axonema (Porte y Follenius, 1960; Russo y Pisanó, 1973). En *Hemirhamphodon* sp. (Perciformes, Hemiramphidae) ellas están bilateralmente, de extremo a extremo (Jamieson, 1989). En *Pantodon* (Osteoglossiformes) ellas forman 9 hélices (Van Deurs y Lastein, 1973). En *Lepadogaster* (Osmeriformes, Gobiesocidae), hay de 6-10 mitocondrias elongadas alrededor de las bases de los dos flagelos (Mattei y Mattei, 1978b).

En *Jenynsia* (Dadone y Narbaitz, 1967) una vaina submitocondrial yace entre las mitocondrias y el canal citoplasmático. Una diferenciación de la capa interna del collar citoplasmático ocurre en otros *Neopterygii*, por ejemplo en el *Sternarchus albifrons* (Gymnotiformes) (Jamieson, 1991). En *Pantodon* (Osteoglossiformes), hay una vaina fenestrada detrás de la pieza media pero no forma una extensión de ella y hay 9 fibras densas no axonémicas (Van Deurs y Lastein, 1973). En *Citharimus* sp (Characiformes). se encuentra una pieza media inusual, la parte proximal contiene los centriolos y alguna mitocondria pequeña y la distal presenta estructura globular conteniendo túbulos ordenados regularmente (Mattei y col., 1995).

En los espermatozoides **aflagelados** de los Mormyridae (Osteoglossiformes) (Mattei y col., 1972) como en otros teleósteos, unas pocas mitocondrias globulares, yacen en un polo de la célula, mientras que en Gymnarchidae (Osteoglossiformes) (Mattei y col., 1967a) ellas están ordenadas irregularmente.

Con referencia a los centriolos, en el caso de los *Neopterygii*, se ha observado que si está presente una fosa nuclear basal, los centriolos se encuentran dentro de ésta. (espermatozoide tipo I de Mattei, 1970). La localización de centriolos externamente a la fosa o excéntricos al núcleo (espermatozoide tipo II) es una condición percoide extendida y está ejemplificada por los Perciformes: *Upeneus prayensis* (Haemulidae) (Mattei, 1970), *Lates calcarifer* (Centropomidae) (Jamieson, 1991) y en percas (Lahnsteiner y col., 1995) y en Mugiliformes, *Parapercis* sp. (Mugilidae) (Mattei, 1970). Una condición intermedia ocurre en el mugilido *Liza* (Mattei, 1970; Bruslé, 1981), y en los Perciformes *Galeoides decadactylus* (Polynemidae) en los Blenniidae *Blennius cristatus* y *Ophioblennius atlanticus* y en el *Clinis nuchipinnis* (Clinidae) (Mattei, 1970). Estas dos condiciones definidas para Perciformes son aplicables a otros órdenes (Jamieson, 1991).

Un ordenamiento mutuamente perpendicular de los centriolos proximal y distal (cuerpo basal), recuerda el de los centriolos en las células somáticas y es interpretado como plesiomórfico (caracteres comunes que comparten varios grupos) para las células

espermáticas. Este parece ser el ordenamiento básico en los Neopterygii, como es visto en *Lepisosteus osseus* y está diseminado a través de los restantes neopterygios, por ejemplo, en *Alburnus alburnus* y *Barbus barbus* (Cypriniformes); en *Trachinocephalus myops* (Aulopiformes); en *Neoceratias spinifer* (Lophiiformes); en *Oligocottus maculosus* (Scorpaeniformes); en los Perciformes *Plectropomus lepidorus*, *Vomer setapinnis*; y en los Cichlidae, *Hemirochromis fasciatus*, *Tilapia nilotica* y *Oreochromis niloticus* (Guha y col., 1988); en *Gastrophysus hamiltoni* (Tetraodontiformes); en *Fundulus heteroclitus* (Cyprinodontiformes), y en Atheriniformes, *Pseudomugil* sp. y *Cairnsichthys* sp. contrastando con la reducción del centriolo proximal en los *Melanotaenia* relacionados (Jamieson, 1991).

En muchos Neopterygii incluyendo *Papyocranus afer* (Osteoglossiformes) (Mattei, 1970); *Leuciscus leuciscus* (Cypriniformes) (Stein, 1981); *Clarius senegalensis* (Siluriformes) (Mattei, 1970) y *Paracheirodon inési* (Characiformes) (Jamieson, 1991), los dos centriolos están, uno respecto del otro, en un ángulo que excede los 90°.

Los centriolos proximal y distal, raramente son paralelos, una condición vista en los Osteoglossiformes *Pantodon* sp. (Van Deurs y Lastein, 1973) cuando el centriolo proximal es visible; y en *Gymnarchus* (Gymnarchidae) (Mattei y col., 1967a). A veces los centriolos proximal y distal son serialmente coaxiales en la misma línea. Esta condición es frecuentemente acompañada por la penetración profunda de la fosa basal del núcleo como en *Scorpaena angolensis* (Scorpaeniformes); *Pegusa triophthalmus* (Pleuronectiformes, Soleidae); en los Tetraodontiformes, *Balistes forcipatus*, *Pseudobalistes fuscus*, *Aluterus punctatus*, y *Chilomycturus reticulatus*; y en *Upeneus prayensis* (Perciformes) (Mattei, 1970).

El centriolo proximal puede estar reducido como en los Atherinomorpha, *Melanotaenia duboulayi* (Marshall, 1989) y Poeciliidae y en el Perciformes *Hemirhamphodon pogonognathus* (Jamieson, 1991).

Excepcionalmente el cuerpo basal es prenuclear como en *Lepidogalaxias* sp. (Osmeriformes) (Pusey y Stewart, 1989). Éste género puede ser único entre los peces investigados en que a los centriolos le faltan tripletes, aunque solo dobletes han sido vistos en *Hypseleotris galii* (Perciformes) (Jamieson, 1991).

Nueve rayos satélites, radiando desde el centriolo distal, están bien desarrollados en los Atheriniformes, *Craterocephalus* y *Quirichthys*, pero no están o están débilmente desarrollados en otros Atheriniformes, mientras que ambas condiciones ocurren en *Melanotaenia* y están esporádicamente presentes en otros grupos (Marshall, 1989).

**El axonema:** la ubicación del flagelo es central o excéntrica. El acuaesperma en general es **monoflagelado** como en *Silurus glanis* (bagre europeo) y en *Clarias garipinus* y *Herobranchius longifilis* (bagres africanos) (Emel'yanova y Makeyeva, 1992), entre otros, raramente puede tener dos flagelos, en ambos casos son mucho más frecuentes los del tipo 9+2. En Elopomorpha y en *Lampanyctus* (Myctophiformes), sin embargo el axonema es 9+0, los dos centrales están ausentes (Mattei y col., 1972a; Billard y Ginsburg, 1973; Todd, 1976).

La **biflagelaridad** de los espermatozoides está dada porque éstos utilizan ambos cuerpos basales para el desarrollo de sus flagelos. Se conoce en los Siluriformes, *Ictalurus punctatus* (Ictaluridae) (Poirier y Nicholson, 1982), Malapteruridae (Mattei, 1988) y *Rhamdia sapo* (Pimelodidae) (Jamieson, 1991); en Apogonidae (Perciformes) (Mattei, 1988), en *Opsanus tau* y *Porichthys notatus* (Batrachoidiformes, Batrachoididae) (Stanley, 1965), en *Lepadogaster lepadogaster* (Osmeriformes, Gobioesocidae) (Mattei y Mattei, 1978b) y en *Lampanyctus sp.* (Myctophiformes, Myctophidae), (Mattei y Mattei, 1976a).

Hasta el momento, se ha reportado que el flagelo ha sido perdido solamente en Mormyridae y Gymnarchidae (Osteoglossiformes) (Mattei y col., 1967a), con desarrollo en *Gymnarchus* de muchos túbulos citoplasmáticos, además hay informes no confirmados de esa pérdida en *Lampanyctus hectoris* y *Diaphus danae* (Myctophyiformes) (Young y col., 1987).

Raramente se desarrollan fibras accesorias con distintos ordenamientos y orígenes. En *Pantodon buchholzi* (Osteoglossiformes), de fecundación interna, nueve fibras espirales, se desarrollan débilmente (Jamieson, 1991).

El flagelo puede tener aletas, que son extensiones de la membrana citoplasmática. Hay una aleta simple en el flagelo del espermatozoide de *Esox* (Esociformes) (Billard, 1970a) y en el género *Maccullochella* (Perciformes, Percichthyidae) (Jamieson, 1991) y en algunas regiones de la cola, en algunas especies con dos flagelos. Dos es el número usual aunque a veces tres, están presentes en Aplocheilidae (Cyprinodontiformes) (Thiaw, 1986). Las aletas están ausentes, por pérdida apomórfica (caracteres exclusivos de un grupo), en los Ostariophysii (Cypriniformes, Siluriformes, y Characiformes) (Jamieson, 1991). Las aletas están reducidas en Poeciliidae (Mattei y col., 1967b; Russo y Pisanó, 1973) o ausentes en *Hemirhamphodon* (Perciformes) y *Lepidogalaxias* (Osmeriformes) (Leung, 1988) por adquisición de fecundación interna, la cual debe ser un modo secundario de fecundación en los Atherinomorpha y Osmeriformes.

La septación parcial de los dobletes de los microtúbulos, ocurre en el espermatozoide de aquellos peces donde las mitocondrias forman un simple anillo o un cuerpo en forma de C. La septación involucra a los dobletes 1 2 6 7 en *Lepisosteus* (Asfzelius, 1978); 1 2 5 6 7 en Argentinoidei y Galaxioidea (Osmeriformes), 1 2 3 5 6 7 en salmónidos y 1 3 5 6 7 en engraulidos (Mattei, 1981).

En *Anarhichas lupus* (Perciformes), el flagelo es excéntrico (fecundación interna.) (Pavlov y col. 1997). En el guppy (Cyprinodontiformes) (Billard, 1970a) y en *Oncorhynchus mykiss* (Salmoniformes) (Billard, 1983) el flagelo es central. En la carpa (Cypriniformes) y el pike (Esociformes) el flagelo está ubicado sobre un costado de la cabeza (Billard, 1969).

Muchos representantes de los Percomorpha tienen un simple acuaesperma anacrosomal, con o sin asimetría y fecundación externa. La fecundación interna ha evolucionado independientemente en unos pocos grupos de esta serie, por ejemplo en la familia Embiotocidae del orden Perciformes y los espermatozoides son elongados y difieren entre los grupos (Jamieson, 1991). Se han estudiados algunos órdenes: Beryciformes, Scorpaeniformes, Gasteroteiformes, Zeiformes, Dactylopteriformes, Pleuronectiformes, Tetraodontiformes y Perciformes (Mattei, 1991). Respecto del espermatozoide de los Synbranchiformes no se conocen estudios hasta la fecha. La mayor parte de los espermatozoides estudiados son monoflagelados, pero en Apogonidae (Perciformes) son biflagelados.

## LOS CONDUCTOS EFERENTES

Los conductos eferentes, en peces, generalmente están ubicados centralmente en aquellos casos que posean un testículo de tipo lobular restringido y lateralmente en aquellos con testículo lobular irrestringido o tubular anastomosado.

En los Poeciliidae, los lóbulos de cada testículo, desembocan en una cavidad central que equivale a un conducto deferente. Ambas cavidades se unen posteriormente, formando un conducto deferente.

Las células de Sertoli están involucradas en la formación de los conductos eferentes en Cyprinodontiformes, Poecillidae (Grier, 1981) y Godeidae (Grier y col, 1978); en Perciformes, Embiotocidae (Gardiner, 1978b) y Sciaenidae (Grier y col. 1987). En *Scianops ocellatus*, también se le atribuye la absorción de cuerpos residuales.

En los peces con testículo lobular irrestringido o tubular anastomosado el conducto deferente en general, está ubicado lateralmente, puede ser muy largo como en los

salmónidos o muy corto como en el pike (*Esox lucio*, Esociformes) y la carpa (Cypriniformes). En general el epitelio es de tipo secretor, produciendo parte del líquido seminal. También está involucrado en la reabsorción del espermatozoide en el róbalo *Lateolabrax japonica* (Perciformes) y en salmónidos (Billard, 1986). Otras de sus funciones son, la reabsorción de cuerpos residuales y almacenamiento del esperma (Grier y Taylor, 1998).

## MATERIALES y MÉTODOS

### 1) LUGARES DE MUESTREO

Las zonas de muestreo fueron elegidas según la abundancia de los ejemplares, la cercanía al laboratorio y los recursos financieros.

Se realizaron muestreos mensuales en ríos y arroyos de la provincia de Corrientes que desaguan en el río Paraná (27°25'S; 58°15'W). Posteriormente, se logró acceder a un espejo de agua tributario del Río Luján, el arroyo Morales (Partido de General Las Heras, Provincia de Buenos Aires) (Figura 5a y b). El recorrido de este arroyo está dentro de un terreno privado lo cual aseguró un muestreo restringido a nuestro grupo de trabajo. En este lugar la frecuencia de captura fue quincenal.

En general, los dos cuerpos de agua donde se muestreó coincidieron en poseer escasa pendiente, cauce angosto, caudal de agua variable según la época del año, quedando algunos sectores con agua estancada durante el verano. El lecho es arcilloso, con gran cantidad de detritos. La mayor parte del sector de pesca se encuentra principalmente cubierto por vegetación profusa de juncales (*Scirpus californicus*). En los sectores libres de vegetación se pueden observar macrofitas flotantes y sumergidas (*Polygonum* sp., *Miriophyllum* sp., *Lemna* sp., *Hydrocotyle* sp.) y helechos acuáticos (*Salvinia* sp.). La ictiofauna acompañante allí identificada, está representada por varias especies: *Cnesterodon* sp. (madrecitas), *Pimelodus clarias* (bagre amarillo), *Cichlasoma* sp. (chanchitas), *Geophagus* sp., *Astyanax* sp., (mojarras), *Hoplias malabaricus malabaricus* (tarariras) además de, tortugas, *Pomacea* sp. (caracoles acuáticos) y *Myocastor coipo* (coipo). En las zonas de muestreo mencionadas también había ganado vacuno que se acercaba a beber agua, y varias especies de aves (garzas, gaviotas, patos, teros y gallaretas). Especies como las tarariras, las gaviotas y las garzas son predadoras de las anguilas.

### TÉCNICAS DE CAPTURA DE LOS EJEMPLARES

Para la captura, se desarrollaron en nuestro laboratorio líneas de mano que fueron mejoradas con los sucesivos muestreos a fin de evitar heridas en la región bucofaringea. Esta modificación aseguró el transporte con vida de los ejemplares hasta el acuario.

**Figura 5. Aspecto típico del ambiente de la anguila criolla.** Arroyo Morales, Ptdo. Gral Las Heras, Provincia de Buenos Aires **a)** Márgenes de arroyos bajas. Debajo de la gran cantidad de juncos que recubren el cauce, se encuentran los ejemplares de *S. marmoratus*. **b)** Arroyo de la misma zona. En las márgenes, de caída abrupta, se encuentran las bocas de las cuevas de las anguilas.

Fotos: gentileza Dr. M. Ravaglia.

a)



b)



Estas líneas constan básicamente de varios metros de hilo de nylon al cual se le agrega una estaca a tierra en uno de los extremos y en el otro, el sistema de captura propiamente dicho. Éste se caracteriza por poseer una pequeña boya y anzuelos de distintos tamaños (N° 4 ó 5) cuya “muerte” se limó previamente y era acompañada por una placa circular de plástico (tipo P.V.C) de unos 3 a 4 cm de diámetro a modo de “chupete”, asegurada por una pieza de caucho (Figura 6). Este método evitaba que el animal tragara profundamente el anzuelo y dañara sus órganos, evitando así posibles infecciones. Este sistema resulto altamente eficiente. Luego de probar varios tipos de cebo, el preferido fue corazón de vaca, por ser un tejido fibroso y por ende difícil de desprenderse del anzuelo. El tiempo de muestreo se extendió desde las primeras horas de la mañana hasta el atardecer. Las líneas se tendían en diferentes partes del arroyo, con punto fijo en tierra, y se controlaban cada 30 minutos.

## **2) TRANSPORTE DE LOS ANIMALES AL LABORATORIO. MANTENIMIENTO DE LOS ACUARIOS Y ALIMENTACIÓN**

Los ejemplares capturados se transportaron en bolsas de arpillera húmedas contenidas en recipientes plásticos con un poco agua del lugar, agregándoseles hielo en caso de temperatura ambiente elevada para bajar su tasa metabólica (Vollman-Schipper, 1978).

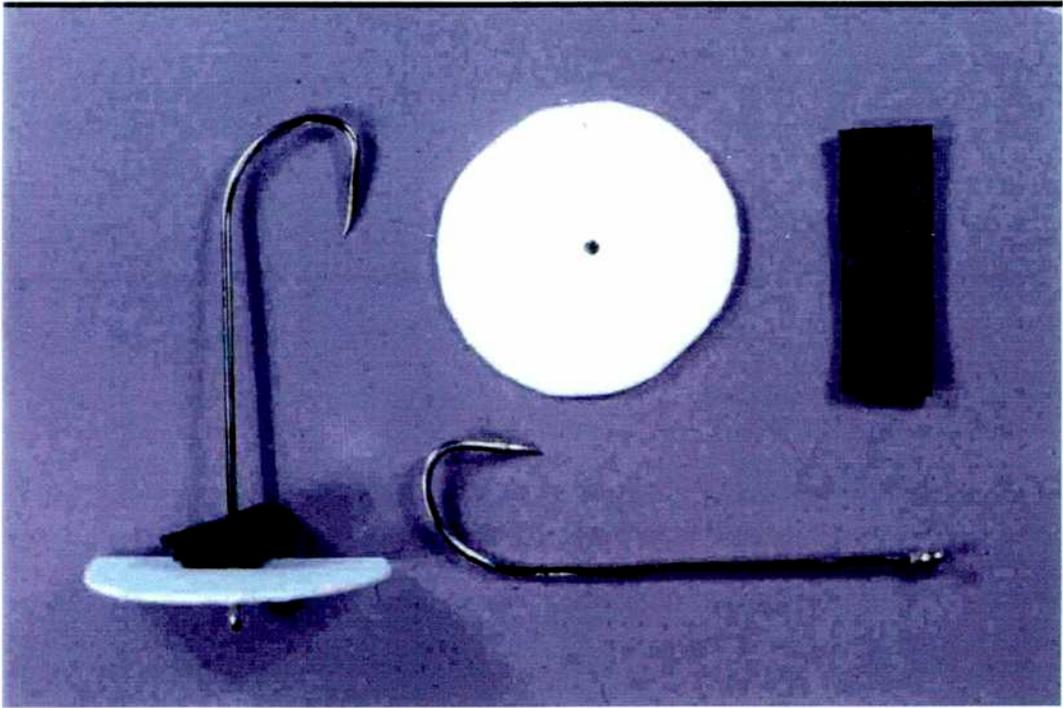
Llegados a destino (Bioterio Central de la Facultad de Cs. Exactas y Naturales, U.B.A), los animales fueron distribuidos en dos piletas de lona de 1500 litros de capacidad con agua corriente, previamente declorada y los recintos fueron cubiertos con red de media sombra (Figura 7).

Una de las piletas fue rellena hasta la mitad con tierra y la otra mitad con agua. La otra se llenó con agua y en su interior se colocaron trozos de caño de P.V.C y mangueras plásticas de aproximadamente 1 m de longitud y diámetros variables. En la primera se dejaron 8 ejemplares y en la segunda, 20. Se observó la adaptación que presentaban a esos ambientes artificiales.

El tipo de alimentación que recibieron los animales mantenidos en cautiverio fue periódico y consistía en pequeños trozos de corazón de vaca, caracoles acuáticos vivos como *Pomacea* sp. (ampularias), peces de pequeño tamaño *Cnesterodon* sp, *Astyanax* sp., (madrecitas y mojarras) y renacuajos de *Bufo arenarum*.

**Figura 6. Adaptación del anzuelo para la captura de los ejemplares. Puede observarse el anzuelo, la muerte limada, la placa circular de plástico y la pieza de caucho a modo de tope.**

Foto: gentileza Dr. M. Ravaglia.



**Figura 7: Bioterio Central.** Algunos animales fueron distribuidos en piletas de 1500 litros con ambientes artificiales a fin de observar su adaptación al cautiverio.



### **3) PROCESAMIENTO DE LOS EJEMPLARES Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS. CARACTERES MORFOMÉTRICOS CONSIDERADOS.**

En este caso, se trabajó con una muestra total de 200 animales, provenientes de muestreos de 3 años. Para una mejor manipulación en el laboratorio, en todos los casos se los anestesió con una solución acuosa de benzocaina (0,1 gr./l) previamente disuelta en alcohol 70°, para inducir sedación (Seigneur, 1984) o paro respiratorio, según el paso a seguir. El animal a procesar, fue colocado en medio caño de P.V.C de 4 cm de diámetro a modo de “camilla”.

Cada ejemplar fue registrado en una planilla donde fue apuntada la fecha de captura, la procedencia, fecha de procesado, color y patrón de manchas presentes en el cuerpo (librea), estado general del ejemplar, color y aspecto de la gónada y fijador utilizado.

Utilizando calibre o cinta métrica, se tomaron los siguientes caracteres morfométricos (Figura 8a):

Largo total (LT): desde el extremo oral hasta el caudal (cm).

Largo de la cabeza (LC): desde el extremo oral hasta la abertura branquial (cm).

Largo abertura branquial-ano (LAA): desde la abertura branquial hasta el orificio anal (cm).

Diámetro máximo del cuerpo a la altura de la abertura branquial (cm). (DAb).

Diámetro máximo del cuerpo a la altura del ano (cm). (DCA).

Diámetro máximo de la cabeza (cm). (DMC).

Peso total (PT)(g).

Peso de la gónada (PG) (g).

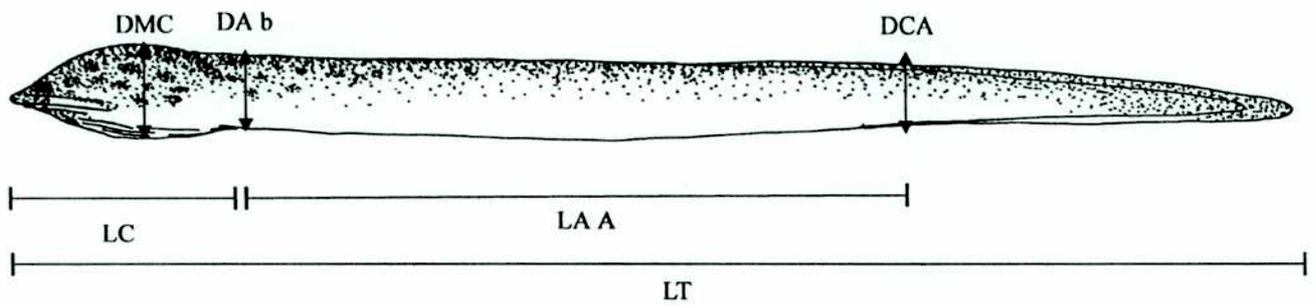
Largo de la gónada (LG) (cm).

Diámetro máximo de la gónada (DMG) (mm).

Se decapitaron por corte abrupto de la cabeza y se disecaron por el plano ventrolateral desde el ano hasta la abertura branquial (Figura 8b hasta e). Al momento de la disección, se registró el estado sanitario de los órganos y de la cavidad del cuerpo. La gónada fue extraída con sumo cuidado para evitar dañarla y se continuó con su procesado.

**Figura 8. Caracteres morfométricos considerados.** A) Esquema indicando DAb: diámetro del cuerpo a la altura de la abertura branquial; DCA: diámetro a la altura del ano; DMC: diámetro máximo de la cabeza; LAA: largo abertura branquial-ano; LC: largo de la cabeza; LT: largo total B) Vista lateral de la cabeza C) Vista ventral de la cabeza mostrando abertura branquial y pliegues bucofaríngeos D) En vista lateral, se observan los pliegues bucofaríngeos expandidos E) En vista ventral, zona del ano.

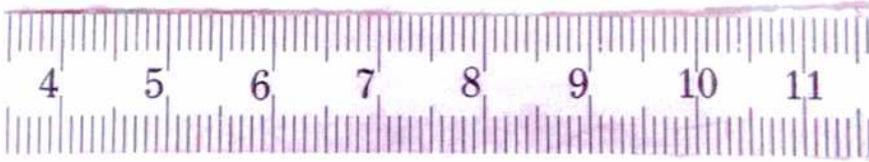
A



B



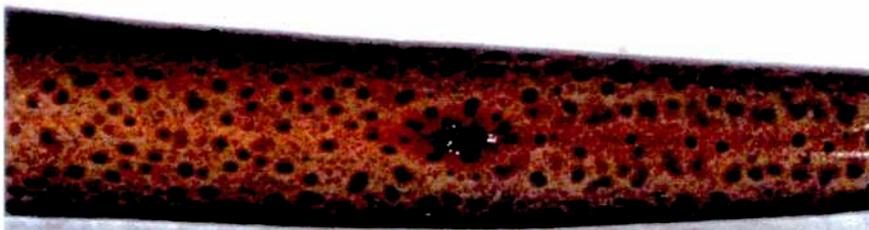
C



D



E



#### **4) ESTUDIO ANATÓMICO E HISTOLÓGICO DE LA GÓNADA**

##### **a) Anatomía**

Se observó a ojo desnudo, la ubicación de la gónada y su relación con los demás órganos. Utilizando un microscopio estereoscópico con cámara clara, se realizó el esquema correspondiente.

##### **b) Microscopia óptica**

Las gónadas extraídas fueron fijadas y almacenadas en formaldehído 4% (neutralizado con buffer fosfato 0.1M) o en líquido de Bouin (70 ml de solución acuosa saturada de ácido pícrico, 25 ml de formol 100% y 5 ml de ácido acético glacial 1,5M) durante 8 hs. Las muestras fijadas en Bouin, fueron pasadas a alcohol 70° para su decoloración y conservación (Martoja y Martoja Pierson, 1970; Pearse, 1985).

Pequeños trozos (0,5-1cm) de la parte anterior, media y posterior de los testículos fueron deshidratados en gradación ascendente de alcoholes e incluidos (orientados previamente con el fin de obtener cortes transversales y longitudinales) en parafina (punto de fusión 56°C-58°C) o en plástico (glicometacrilato JB-4, Polysciences Inc., USA). Se realizaron cortes con micrótopo de 3,5µm (para plástico) y 7 µm (para parafina) y fueron montados en portas bañados previamente con gelatina o albúmina. Se los coloreó con técnicas histológicas e histoquímicas: Hematoxilina de Carazzi-Eosina alcohólica, Tricrómico de Masson, P.A.S.-Hematoxilina, Tionina-acid Schiff/hematoxylin/Metanil Yellow (Quintero-Hunter y col.,1991).

Las células germinales fueron medidas con un ocular micrométrico, calculándose la media y la desviación estándar ( $X \pm DS$ ). Los preparados fueron examinados y fotografiados con un microscopio Microphot FX, Nikon utilizando película fotográfica tipo Ektacrome 64 y 160 asa, Ilford PanF 50 asa blanco y negro y Kodak color de 100 y 400 asa.

##### **c) Composición de la población**

Se determinaron los porcentajes de machos primarios y secundarios presentes en la población.

Para cada individuo, se determino el IGS aplicando la fórmula:

Peso de la gónada

$$\frac{\text{-----}}{\text{Peso corporal - Peso de la gónada}} \times 100 = \text{IGS}$$

**d) Microscopía electrónica de transmisión (M.E.T.)**

Muestras de testículo de 2 mm de espesor fueron fijadas por 4h. a 4°C en glutaraldehido 2% en buffer cacodilato 0.1M, pH 7.2 y en Truby (glutaraldehido 3% en buffer fosfato 0.1M, pH 7.4 y CaCl<sub>2</sub> 0,1%). Luego de la fijación se lavó en buffer cacodilato- sacarosa o en buffer fosfato respectivamente. La postfijación se realizó en tetróxido de osmio 1% en el buffer respectivo, durante 1:30 h. a temperatura ambiente. Las muestras fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de alcoholes hasta etanol 100°-óxido de propileno (1:1) y finalmente óxido de propileno puro. Seguidamente las muestras fueron embebidas en una mezcla de resina Epon 812 y Araldita. Los cortes se realizaron con un ultramicrotomo Reichert y fueron coloreados con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se examinaron bajo microscopio Zeiss EM 109 utilizando película fotográfica tipo Ilford PanF 50 asa. Los cortes semifinos (1μ) fueron coloreados con azul de toluidina y observados con microscopio óptico para orientación previa en el material a estudiar en el M.E.

**e) Microscopía electrónica de barrido (M.E.B)**

Pequeñas trozos de la gónada (aprox. 2mm) en diferentes planos de corte fueron deshidratados en gradaciones crecientes de etanol hasta llegar a 100°. Luego acetona:etanol 100° (50/50) y finalmente acetona pura. A las muestras una vez secadas al aire, se les realizó punto crítico. Posteriormente fueron montados y metalizadas con un baño de oro paladio para su observación. Las muestras se analizaron bajo un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-25S II utilizando película fotográfica Plus-X Pan120 asa. Esta técnica permitió principalmente analizar la disposición espacial de los elementos celulares dentro del testículo.

El semen obtenido por homogenato de gónadas maduras (o por masaje abdominal en el caso de los experimentos de inducción, capítulo 3), fue colectado en tubos Eppendorf secos y se fijó cada muestra en glutaraldehido 5% (en buffer fosfato 0,1M, pH7,2) durante 1h. (adaptado de Lahnsteiner y Patzner, 1991). Posteriormente se centrifugó por 15 min. a 800 r.p.m. en frío. Seguidamente, se descartó el sobrenadante con pipeta Pasteur y se lavó el pellet en una solución lavadora de buffer fosfato 0,1M con 10% de sacarosa, por 30 min. Se repitió la centrifugación en la misma solución, se

retiró el sobrenadante y se procedió a deshidratar el pellet. Esta consistió en centrifugaciones sucesivas de 7 minutos a 500 r.p.m. con alcoholes de concentración creciente (50°, 70°, 96° y 100°) y finalmente acetona. Cada muestra de pellet fue resuspendida en acetona y una gota de aprox. 0,1 ml fue sembrada en un cubre de vidrio limpio y seco. Se realizó punto crítico y baño de oro paladio. Las muestras fueron analizadas bajo un microscopio electrónico JEOL JSM-25S II utilizando película fotográfica tipo Plus-X Pan 120asa.

## RESULTADOS

### ESTUDIO ANATÓMICO e HISTOLÓGICO DE LA GÓNADA

La gónada esta ubicada a lo largo de la región medio dorsal de la cavidad abdominal, por debajo de los riñones, y ocupa dos tercios de la longitud total del cuerpo, extendiéndose desde el bazo hasta la papila urogenital. La gónada es alargada, cilíndrica, y a diferencia de la mayoría de los peces, es impar. El testículo está sostenido del techo de la cavidad abdominal por un mesorquio y unido ventrolateralmente al tubo digestivo por mesenterios (Figura 9).

Dentro de la cavidad general del cuerpo (la cual ocupa un 70% aprox.), se ubica el hígado, de forma alargada y sin lobulaciones y está unido dorsolateralmente al tubo digestivo (también alargado) por medio de bridas conectivas. La vesícula biliar es conspicua y el bazo está bien desarrollado. Como en todos los Synbranchiformes, no se observa vejiga natatoria (Figura 9).

El testículo es de forma elongada y cilíndrica en los machos maduros y de forma filiforme en los que están fuera de la época reproductiva. La porción anterior de la gónada es más delgada y está localizada a la altura del bazo mientras que la porción posterior termina en la papila urogenital, la cual se abre detrás del ano.

*S. marmoratus* es un pez hermafrodita protogínico diándrico. Presenta dos tipos de machos: primarios que nacen como tales y secundarios que provienen de la reversión sexual de hembras funcionales. Dado que esta especie carece de dimorfismo sexual externo, sólo a través del estudio histológico, se pudo determinar el sexo de cada individuo.

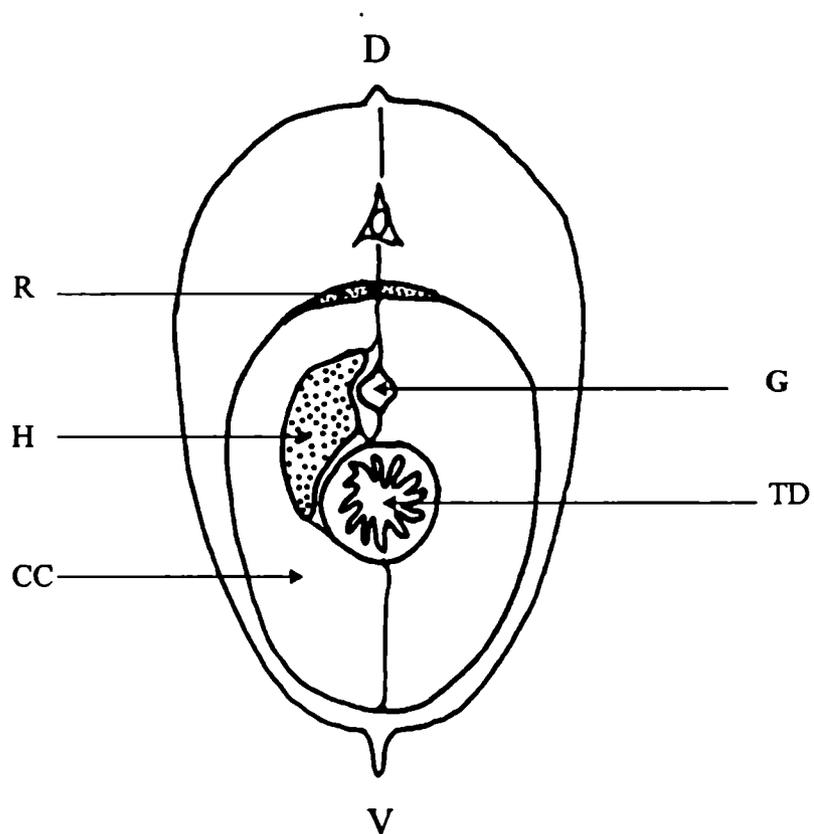
#### El testículo del macho primario

El testículo está constituido por dos cordones unidos medialmente por tejido conectivo, por lo cual se los denominó machos de "doble cordón". En corte transversal, la gónada presenta dos lóbulos testiculares de forma acorazonada en los individuos que no están en época reproductiva y de forma arrifonada en los espermiantes (Figuras 10a y b). La figura 26a muestra el aspecto general bajo microscopio electrónico de barrido.

Periféricamente se observa el epitelio y una capa de tejido conectivo, llamada cápsula testicular (Billard, 1986). Su espesor es de 15 a 20  $\mu\text{m}$ , independientemente del estado de madurez del animal, pero es más prominente en los machos de mayor tamaño

**Figura 9.** Esquema de un corte transversal de anguila, a la altura de la gónada.

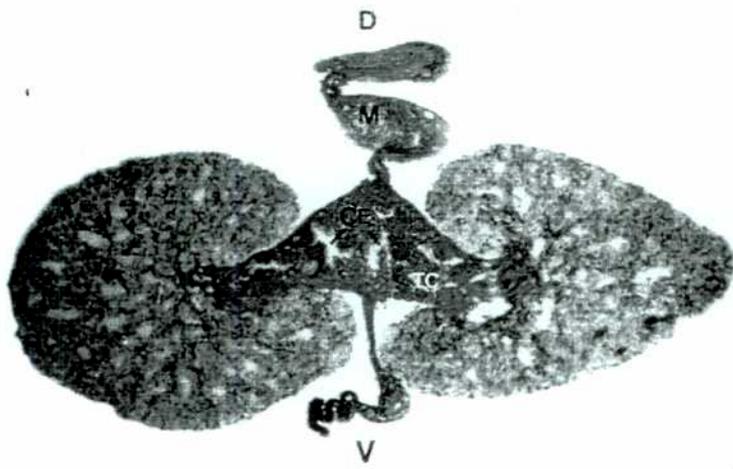
CC: cavidad del cuerpo; D: dorsal; G: gónada; H: hígado; R: riñones; TD: tubo digestivo; V: ventral. 2x.



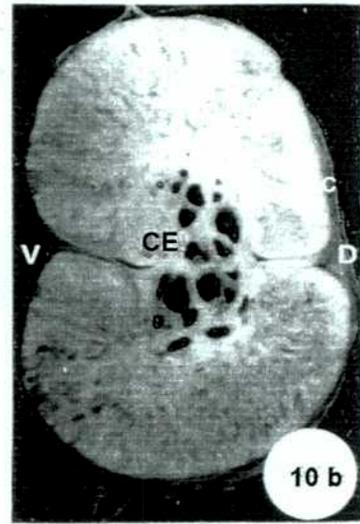
**Figura 10. Testículo de macho primario**

**a)** Corte transversal de un testículo inmaduro. Hematoxilina de Carazzi-eosina 35x. **b)** Corte transversal de un testículo maduro. 2x. **c)** Corte transversal de los lóbulos de un macho inmaduro. Tricrómico de Masson 100x. **d)** Detalle de la cápsula testicular y la región distal de los lóbulos de un macho maduro. Tricrómico de Masson 200x. **e)** Corte transversal de lóbulos proximales del testículo de un macho maduro. Hematoxilina-eosina. 100x. **f)** Corte transversal de lóbulos espermáticos en comunicación con los conductos eferentes. 100x. **g)** Corte transversal de los conductos eferentes. 200x. Hematoxilina-eosina.

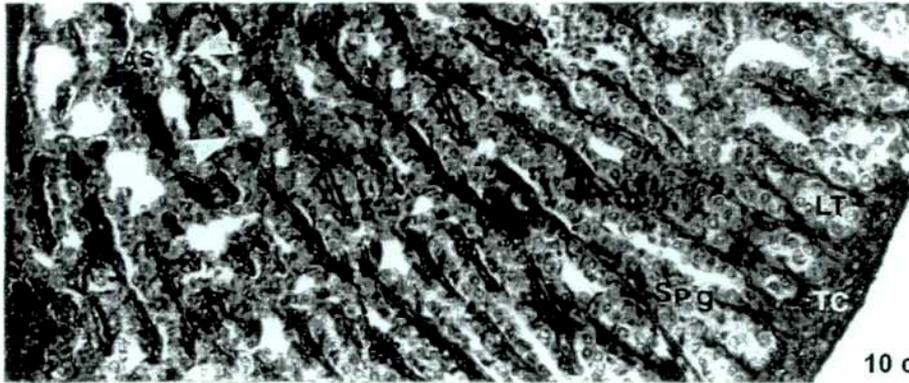
As: anastomosis, C: cápsula testicular, CE: conductos eferentes, CT: espermatocisto, D: dorsal, E: epitelio, IC: intercomunicación lobular, LT: lóbulo testicular, LL: luz del lóbulo, M: mesorquio, Mc: centro melanomacrofágico, MY: células mioides, PA: pequeñas aberturas (comunicación del lóbulo con el conducto eferente), SPG: espermatogonia, SPM: esperma, Sq: epitelio escamoso, TC: tejido conectivo, V: ventral.



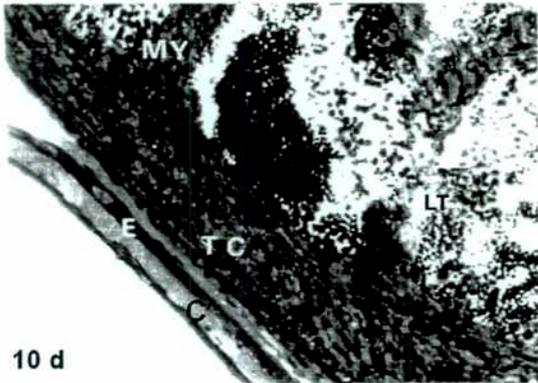
10 a



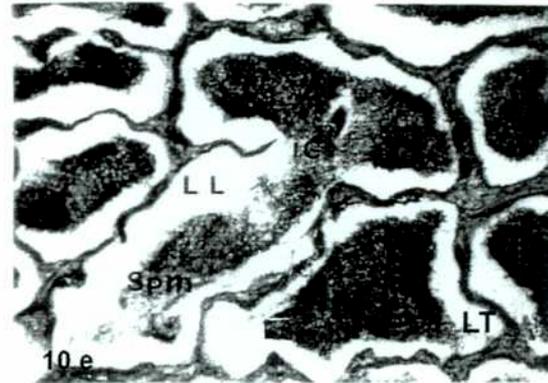
10 b



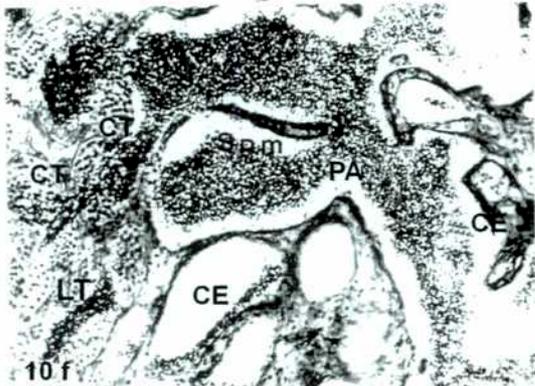
10 c



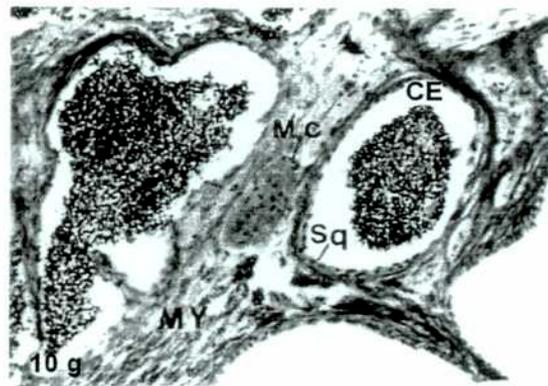
10 d



10 e



10 f



10 g

(Figuras 10c y d). La cápsula envía proyecciones desde la periferia hacia el interior separando a los lóbulos espermáticos entre sí, dando lugar a dos compartimientos, el intersticial y el germinal. Ambos muestran una distribución radial. En la zona central se encuentran los conductos eferentes, de diferentes diámetro y en número variable de 10 a 12 (Figuras 10a y b).

Este testículo es de tipo lobular irrestricto, está organizado en lóbulos que terminan ciegos en la periferia testicular (Figura 10c) y en su extremo proximal se abren en los conductos eferentes. Están constituidos por espermatocistos que contienen cada uno de los estadios de la espermatogénesis (Figura 10e). La diferenciación celular es altamente sincrónica dentro de cada espermatocisto, pero todos ellos no son sincrónicos entre sí. En los individuos maduros, los lóbulos poseen una luz central llena de esperma (Figura 10e). Cerca de los conductos eferentes centrales, los lóbulos conteniendo esperma, se anastomosan entre si, permitiendo el paso del mismo a través de pequeñas aberturas (Figura 10f).

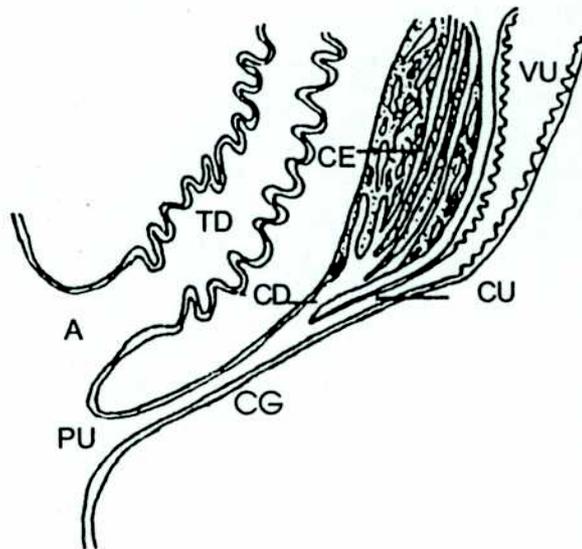
Los conductos eferentes poseen un epitelio plano, están rodeados por células mioides y ocasionalmente se observan centros melanomacrofágicos (Figura 10g). En las gónadas de los machos inmaduros, los conductos poseen un epitelio cúbico y la mayoría están colapsados. En los machos maduros es plano. Es decir que la altura de estos epitelios está asociada con los estadios reproductivos. Los conductos se extienden a lo largo de la gónada fusionándose en la parte posterior, dando lugar al conducto deferente que es muy corto. Antes de alcanzar la papila urogenital, el conducto deferente se fusiona con el conducto urinario proveniente de la vejiga formando el urogenital, cuya salida se ubica inmediatamente posterior al ano (Figura 11).

### **La gónada de los revertantes**

El testículo proveniente de la reversión sexual, se desarrolla dentro de un simple ovario de una hembra funcional (Figura 12a). En los animales transicionales, hay una importante proliferación de elementos germinales masculinos los cuales se hacen visibles dentro de la lamela ovárica como conjuntos de células espermatogénicas localizadas entre los oocitos (Figura 12b y c). La reversión comienza en la región lindante con la cavidad ovárica y parece ser paulatina, ya que al principio se observan individuos con escaso tejido testicular y abundante tejido ovárico en regresión, pasando por toda una gama en la cual el tejido testicular va ganando espacio hasta reemplazar totalmente al tejido ovárico. Cabe destacar que si bien el reemplazo del tejido es paulatino, el proceso

**Figura 11.** Esquema de corte sagital de la región distal del sistema urogenital de un macho primario, mostrando la porción caudal del tracto genital.

A: ano, CD: conducto deferente, CE: conducto eferente, CU: conducto urinario, CG: conducto urogenital, PU: papila urogenital, TD: tubo digestivo, VU: vejiga urinaria.



**Figura 12. Progresión de una gónada en reversión.**

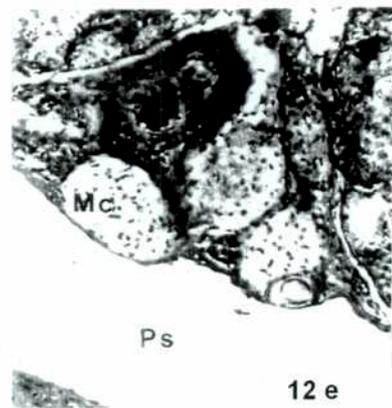
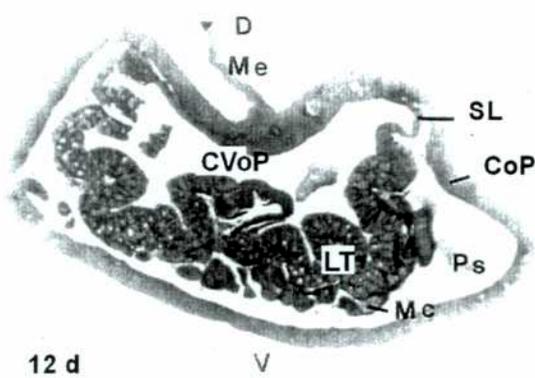
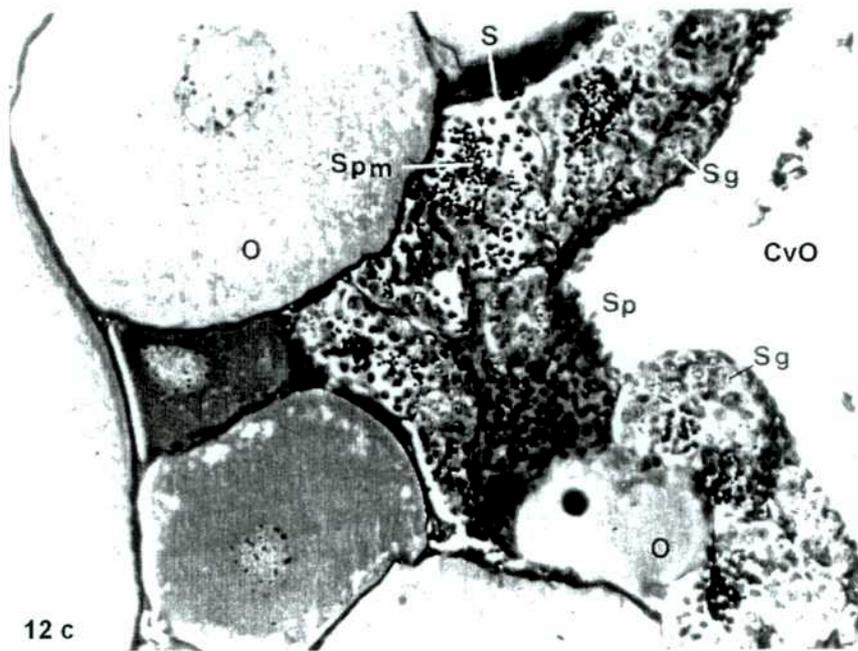
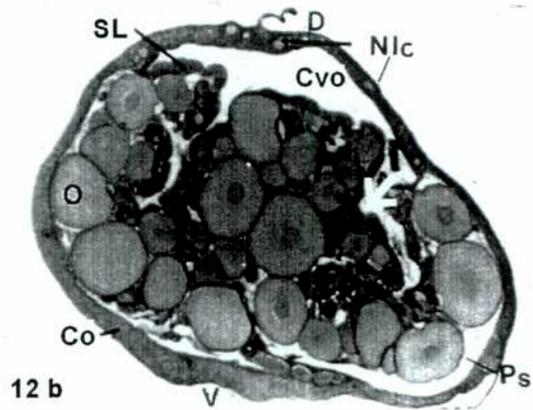
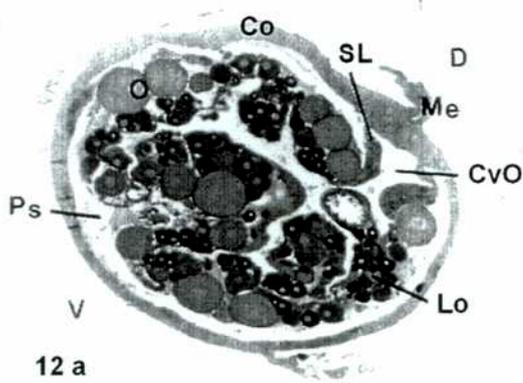
a) Corte transversal de un ovario. Hematox-eos. 40x. b) Corte transversal de una gónada en proceso de reversión inicial. Hematox-eos. 40x. c) Detalle de tejido espermático dentro de la lamela gonadal (flecha de figura b). 200x. Hematox-eos. d) Corte transversal de un testículo de un macho inmediatamente después de la reversión. 40x. e) Detalle de centros melanomacrofágicos encontrados dentro de la gónada. Hematox-eos. 200x.

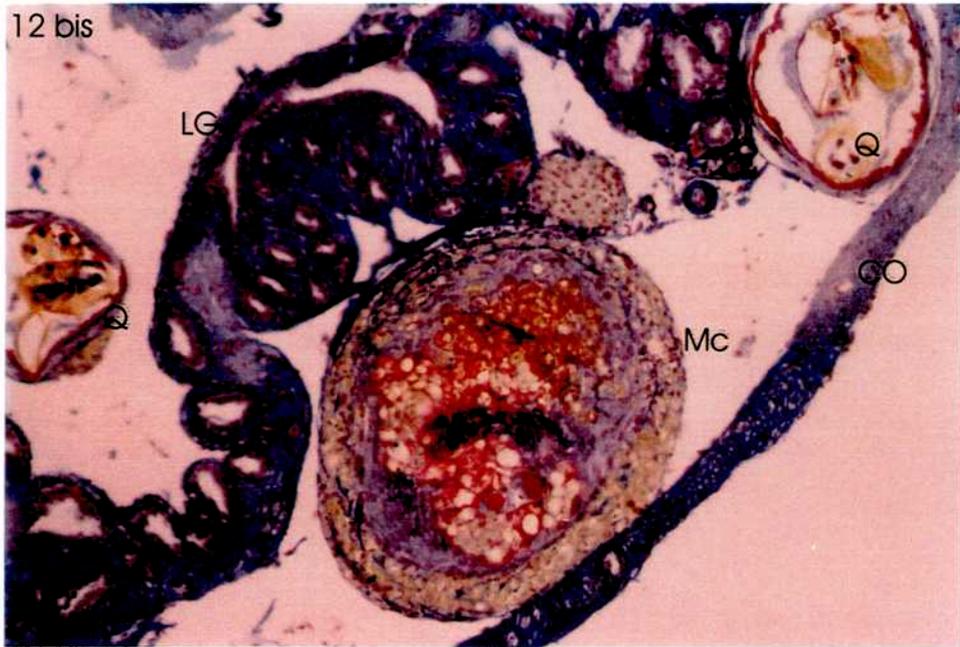
CO: cápsula ovárica, CoP: cápsula ovárica primaria, CvO: cavidad ovárica, CvOP: cavidad ovárica primaria, D: dorsal, Lo: lamela ovárica, LT: lamela testicular, Mc: centros melanomacrofágicos, Me: mesogonio, Nlc: células nerviosas (nerve-like cells), O: oocito, Ps: cavidad pseudovárica, S: espermátidas, Sg: espermatogonia, SL: sostenes laterales, Sp: espermatoцитos, Spm: esperma, V: (ventral).

**Figura 12 bis.**

Detalle de un centro melanomacrofágico de un macho recién revertido. Dentro del mismo se observan restos de un folículo atrésico. También pueden observarse quistes de parásitos. Tricrómico de Masson. 600x.

LG: lamela gonadal: Mc: centro melanomacrofágico: Q: quiste: CO: cápsula ovárica.





de la espermatogénesis parece ser rápido, ya que se encuentran todos los estadios presentes en individuos con un tercio de su gónada invadida por tejido masculino. Consecuentemente, la forma anatómica de la gónada es muy similar a la del ovario excepto por la presencia de conductos espermáticos eferentes (Figuras 12d, 13a y b).

Durante esta transformación, y aún después de ella, se observa gran desorganización del tejido intersticial, una importante irrigación y usualmente se encuentran abundantes centros melanomacrofágicos (Figuras 12d, e y bis).

### **El testículo del macho secundario**

Este testículo está constituido por un único cordón, por lo que se los llama machos de "simple cordón". El nuevo testículo se impone sobre una estructura netamente ovárica. Está envuelto por una cápsula ovárica primaria. Ésta en corte transversal, varía su espesor de 50 a 170  $\mu\text{m}$  de acuerdo con el estado de madurez del animal y es más gruesa cuando el testículo está en reposo (Figuras 13a y b). Está constituida por tejido conectivo rico en fibras colágenas y son observadas células nerviosas redondeadas, de distintos tamaños. La figura 26 b muestra el aspecto general bajo microscopio electrónico de barrido.

Entre la lamela testicular y la cápsula, ventralmente, permanece la cavidad pseudovárica. Ésta es una característica de los testículos de los machos secundarios pese a no ser funcional (Figura 13a). La cavidad dentro de la lamela gonadal, designada como "cavidad ovárica primaria", no desaparece en los machos secundarios (Figuras 13b y c). El testículo está compuesto por lóbulos que se ubican dentro de la lamela ovárica primaria. Este rasgo y la persistencia de una cavidad ovárica primaria, distinguen claramente este tipo de testículo del de un macho primario y es un carácter fundamental para el diagnóstico de la protoginia (Okada, 1966; Liem, 1968).

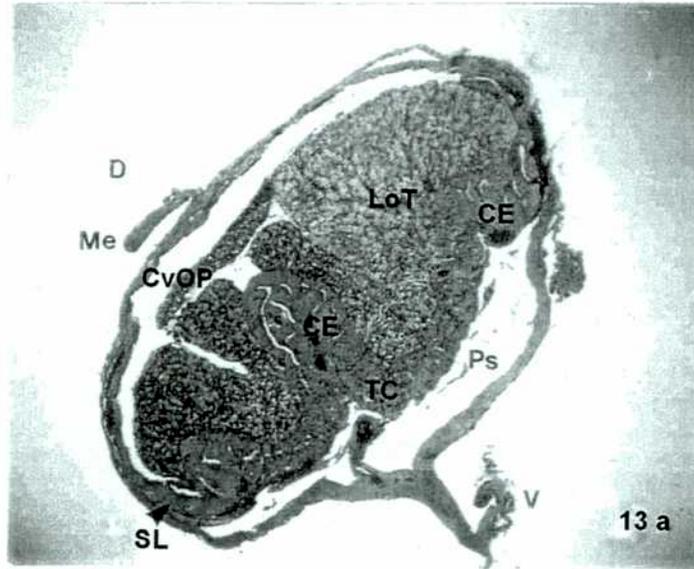
La región ventral del testículo esta cubierta por una capa de tejido conectivo importante que representa una neoformación. Ésta no existe en las hembras. Este tejido conectivo se fusiona a dos soportes laterales, ya existentes en la hembra, los cuales están unidos a la cápsula (Figuras 13a y b). Numerosos conductos eferentes se desarrollan dentro de este tejido y en los soportes laterales (Figuras 13a y c). Las regiones dorsal y lateral de la lamela están recubiertas por una capa delgada de tejido conectivo (Figura 13 d).

Dentro de la lamela, se desarrolla un compartimiento germinal con lóbulos conteniendo espermatocistos en diferentes estadios de la espermatogénesis y un

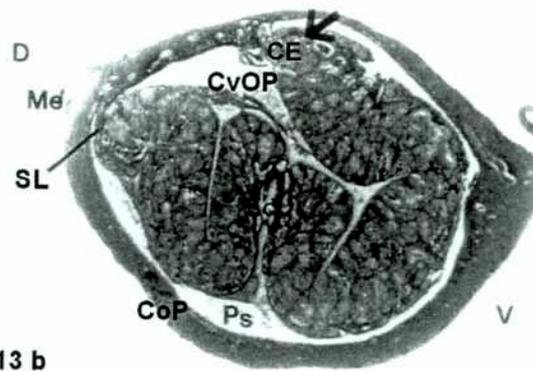
**Figura 13. Testículo de macho secundario**

a) corte transversal de testículo de un macho secundario. Hematoxilina de Carazzi-eosina. 100x. b) Corte transversal de un testículo maduro. 40x. c) Detalle de los conductos eferentes ubicados en los sostenes laterales (flecha de la fig. b) 80x. d) Detalle de los lóbulos testiculares. 100x. e) Detalle de un conducto eferente 200x.

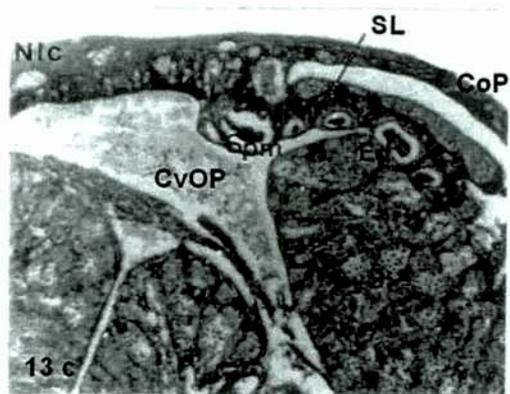
CE: conductos eferentes, CoP: cápsula ovárica primaria, CvOP: cavidad ovárica primaria, D: dorsal, Fml: fibras musculares lisas, LoT: lóbulo testicular, Me: mesorquio, Nlc: células nerviosas (nerve-like cells), Ps: cavidad pseudovárica, S: espermatogonia, Sg: espermatogonia, SL: sostenes laterales, Spm: esperma, Sq: epitelio escamoso, TC: tejido conectivo, TI: tejido intersticial, V: ventral.



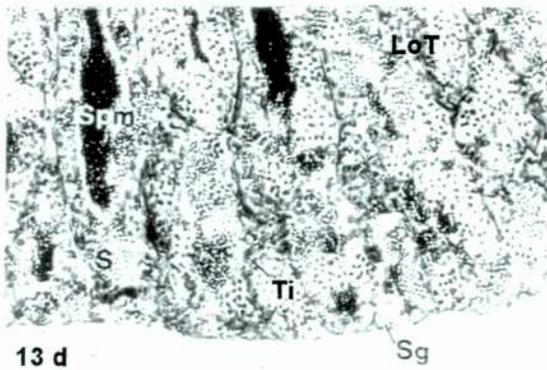
13 a



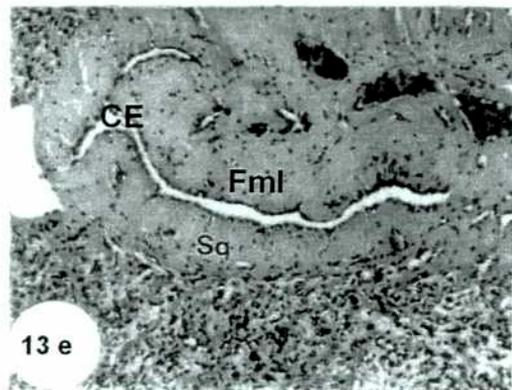
13 b



13 c



13 d



13 e

compartimiento intersticial. Ambos poseen características semejantes a las de los machos primarios (Figura 13d).

Este tipo de testículo es lobular irrestricto. Los lóbulos terminan ciegos en la periferia de la lamela testicular, próximos a la cavidad ovárica primaria. Cuando los lóbulos centrales están llenos de esperma, desagotan en los conductos eferentes centrales. Los lóbulos periféricos se anastomosan entre sí y generan un camino hacia los conductos eferentes laterales. Todos los conductos eferentes poseen un epitelio plano y están cubiertos por fibras musculares lisas (Figura 12e). En la región distal del testículo, los conductos eferentes siguen uno de los dos caminos: aquellos de la región posterior, se abren directamente en el conducto urinario mientras los de la región anterior vierten su contenido en un conducto colector intratesticular. Ambos vierten en el conducto urogenital que termina en la papila (Figura 14) la cual se ubica inmediatamente posterior al ano (Figura 14).

Los centros melanomacrofágicos fueron encontrados en revertantes, en machos primarios y secundarios y a menudo se los observó en asociación con quistes de parásitos y cercanos a vasos sanguíneos. En machos primarios y secundarios el número y tamaño de los centros varió a lo largo del año, siendo mayor en el periodo postreproductivo donde la proporción de células en regresión es mayor.

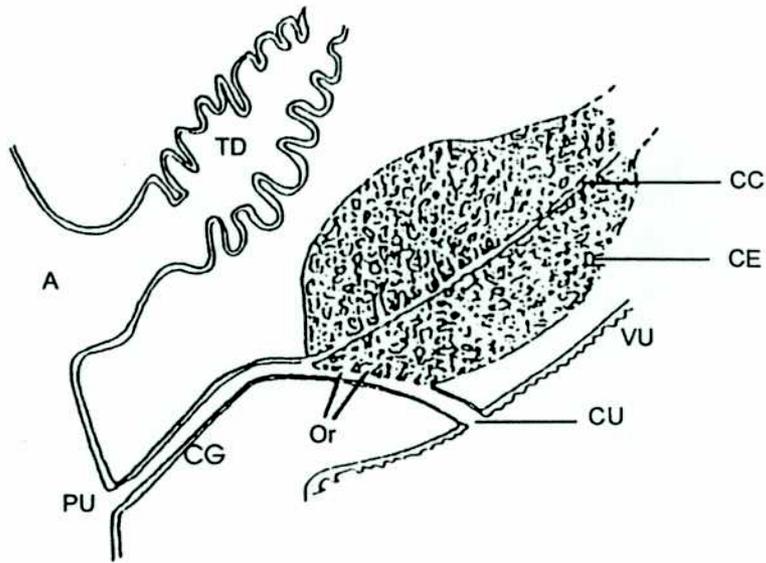
### **COMPOSICIÓN DE LA POBLACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE GONADOSOMÁTICO (I.G.S.)**

En base a los estudios anatómicos e histológicos, se pudo determinar que, de todos los animales muestreados (N=122), 12 (9.8%) resultaron individuos intersexos; 45 (36.9%) fueron hembras y 65 (53.3%) machos. Dentro del grupo de machos, se observó que 13 (20%) resultaron machos primarios mientras que 52 (80%) fueron secundarios (Figura 15). El largo total de los machos primarios capturados varió entre 13 y 88 cm. En el caso de los machos secundarios, entre 56 y 91 cm. Los revertantes poseían una longitud total de 45 a 60 cm.

Se encontró que los machos primarios pueden estar sexualmente maduros desde los 25 cm de longitud total en adelante, mientras que en el caso de los machos secundarios, la madurez sexual sólo se observa después de finalizada la reversión. El cambio de hembra a macho secundario ocurre, ya sea a fines del invierno, o en la primavera o a principios del verano.

**Figura 14.** Esquema de corte sagital de la región distal del sistema urogenital de un macho secundario, mostrando la porción caudal del tracto digestivo.

A: ano, CC: conducto colector, CE: conducto eferente, CG: conducto urogenital, CU: conducto urinario, Or: orificios o aberturas de los conductos eferentes en el conducto urinario, PU: papila urogenital, TD: tubo digestivo, VU: vejiga urinaria.



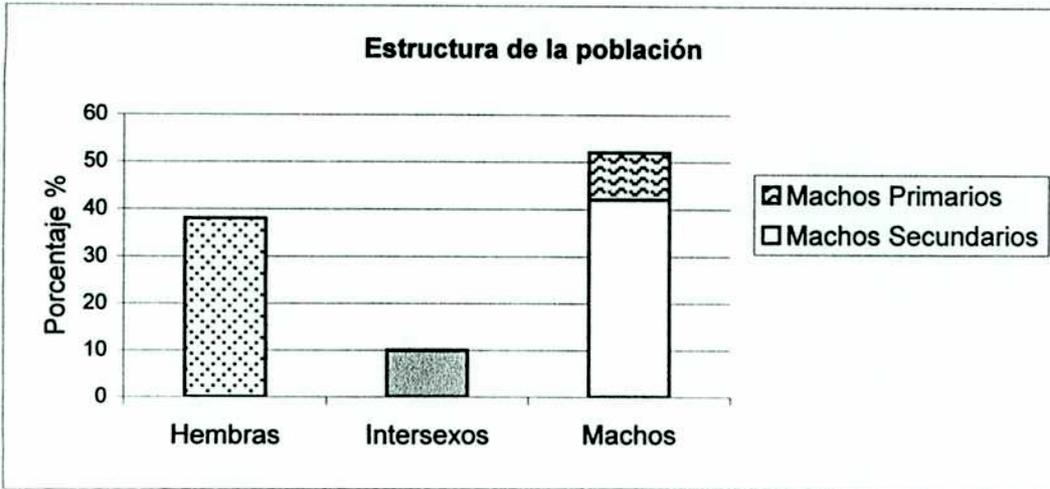


Figura 15: Porcentajes de distribución de la población.

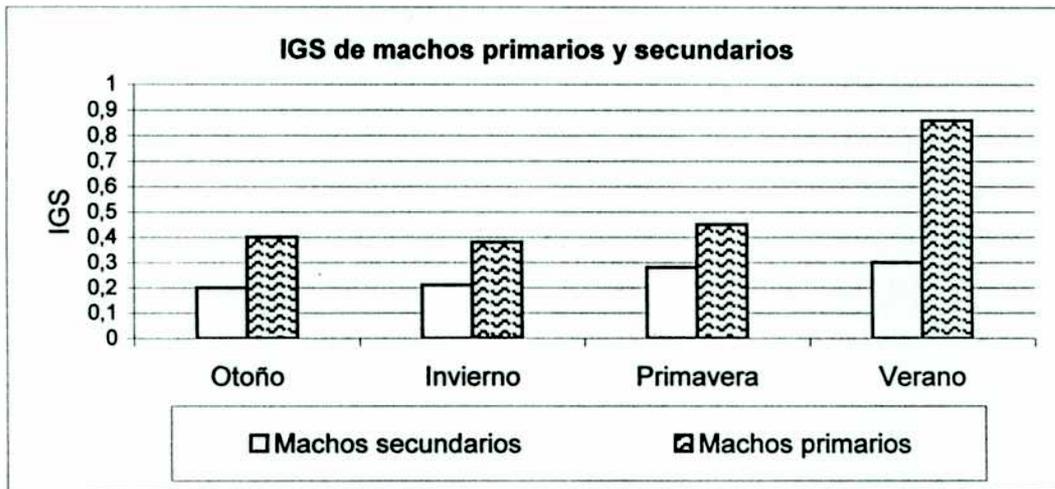


Figura 16: para ambos tipos de machos, el IGS alcanza valores máximos durante el verano.

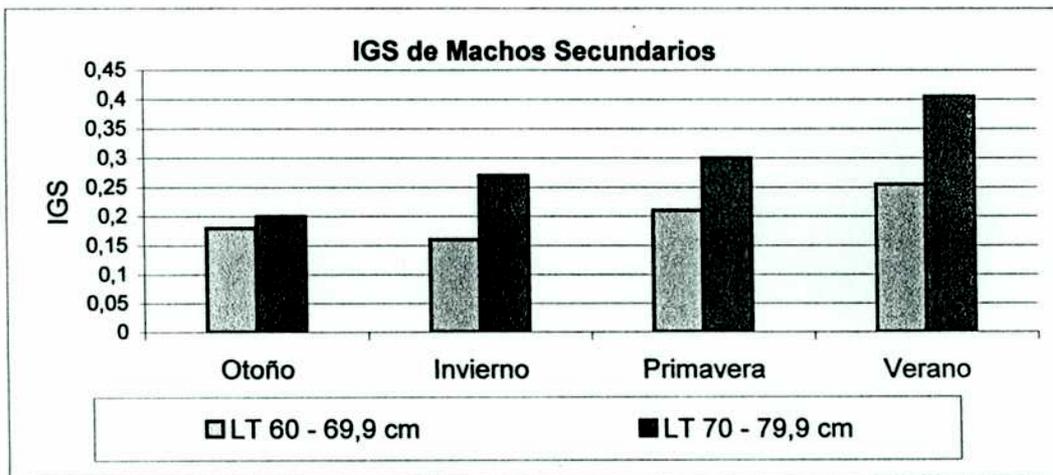


Figura 17: Dentro del grupo de machos secundarios, los que poseen un rango de longitud total entre 70 y 79,9 cm tienen un IGS mayor.

La figura 16 muestra el índice gonadosomático (IGS) durante las diferentes estaciones del año para machos primarios y secundarios. Puede verse que el IGS es más alto durante el verano, aunque el de los machos primarios es mucho mayor que el de los secundarios. Entre los machos secundarios, los individuos entre 60 y 69.9 cm de longitud total, muestran un IGS menor que el de los de 70 a 79.9 cm (Figura 17).

## **ESPERMATOGÉNESIS: ASPECTO ÓPTICO Y ELECTRÓNICO.**

### **A) COMPARTIMIENTO GERMINAL**

El epitelio germinal está localizado dentro de estructuras elongadas definidas como “lóbulos” y están limitados por una membrana basal. Este compartimiento persiste todo el año (Figuras 18a y b). Dentro de ellos encontramos los “espermatozoides”, que están constituidos por células de Sertoli que apoyan sobre una membrana basal y células germinales isogénicas (Figura 19c). Los espermatozoides están en contacto con la membrana basal a lo largo de un solo lado. La espermatogénesis ocurre dentro del espermatozoide.

No se han observado diferencias para ambos tipos de machos a este nivel y por lo tanto se presentan figuras de ambos indistintamente.

**ESPERMATOGONIA A (SPG A):** están siempre presentes. Se tiñen pálidamente, y son las células germinales más grandes en el testículo. El citoplasma es hialino, presenta núcleo prominente, central, ligeramente oval o esférico. Posee cromatina en distintos grados de condensación de acuerdo con la etapa mitótica en la que se encuentran. Tienen un sólo nucleolo prominente, refringente y excéntrico aunque a veces se han encontrado dos. Diámetro nuclear:  $11,73 \pm 1,52 \mu\text{m}$  ( $X \pm DS$ ). Figuras 18a y b.

**MET:** están rodeadas por procesos de células de Sertoli y se distingue claramente la membrana basal. Las mitocondrias se encuentran agrupadas en un polo celular. Son globosas o débilmente elongadas, con mediana cantidad de crestas y su matriz es clara. Se observan cuerpos densos o *nuages* asociados a ellas. Poseen retículo endoplasmático liso (REL) y aparato de Golgi conspicuo, constituido por varias pilas de cisternas. Presencia de polisomas y de cuerpos multilamelares. El nucleolo posee componentes granular y fibrilar. Figuras 18c hasta g.

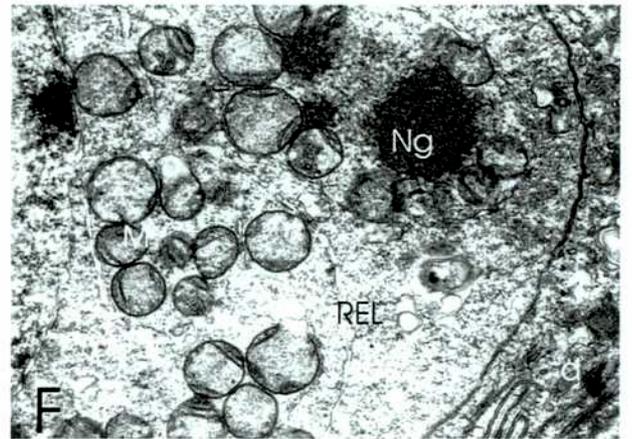
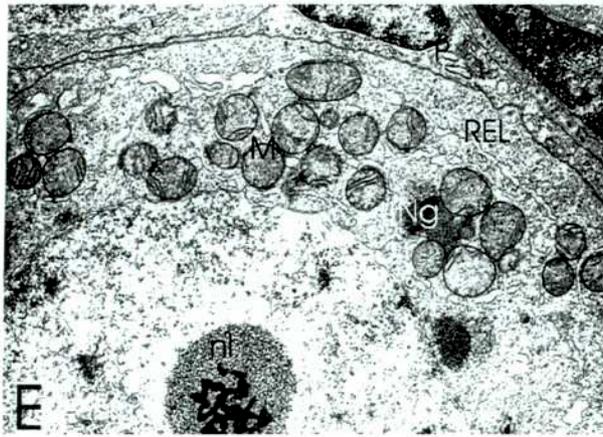
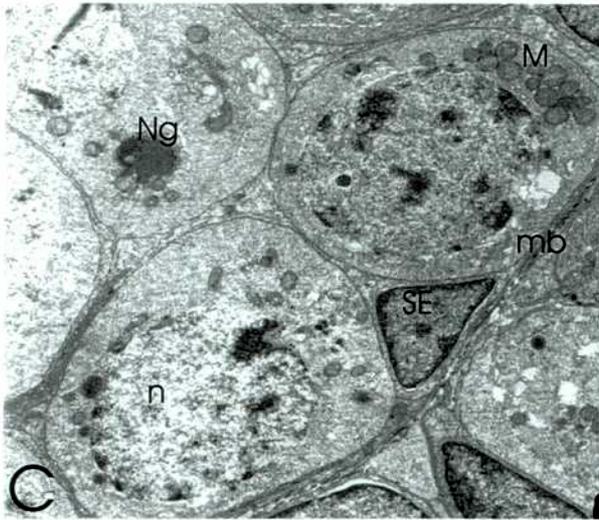
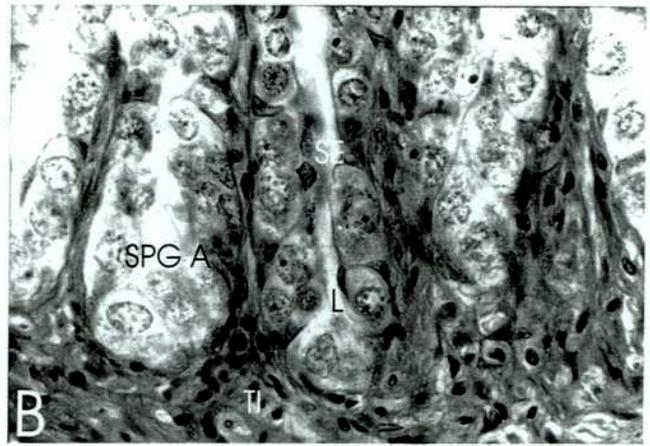
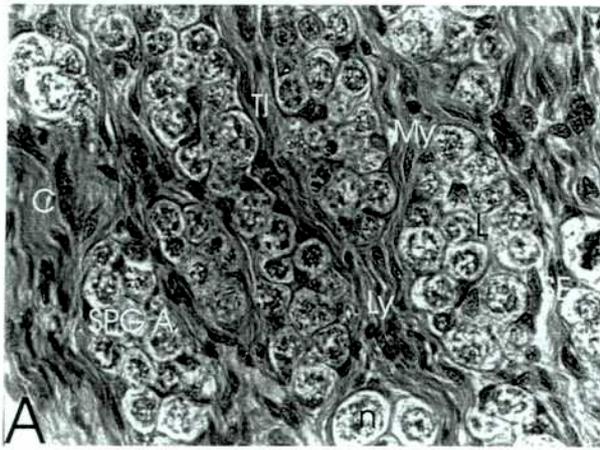
**Figura 18. Espermatogonia A.**

\* Microscopia óptica. Detalle de lóbulos testiculares. **A)** macho primario. Tricrómico de Masson **B)** macho secundario. H- E. Se observa que el macho primario tiene más fibras colágenas que el secundario. 600 x ambas.

C: fibras colágenas, MY: células mioides, L: Lóbulo, Ly: célula de Leydig, Spg A: espermatogonias tipo A, TI: tejido intersticial.

\* Microscopia electrónica. **C)** espermatogonia A rodeada por procesos de la célula de Sertoli. 3000x. **D)** Detalle de una espermatogonia A donde se observa el nucleolo con su componente granular y fibrilar, nuages, mitocondrias ubicadas en su mayor parte sobre un polo de la célula y un cuerpo multilamelar. 4000x. **E)** Magnificación de la zona del núcleo, el nucleolo y de las mitocondrias asociadas con nuages. 7000x. **F)** Detalle de la zona de mitocondrias y nuages. Puede observarse un desmosoma entre 2 células de Sertoli vecinas. 12000x. **G)** Aspecto del aparato de Golgi constituido por varias pilas de cisternas. 7000x.

Cm: cuerpo multilamelar; d: desmosoma, G: Aparato de Golgi, M: mitocondria, mb: membrana basal, n: núcleo, nl: nucleolo; Ng: nuages, P: polisomas; REL: retículo endoplasmático liso; SE: núcleo de célula de Sertoli, Spg A: espermatogonia A.



**ESPERMATOGONIA B (SPG B):** se caracterizan por un gradual decrecimiento en el tamaño celular debido a las sucesivas divisiones mitóticas. Se las encuentra en espermatocistos desde dos células en adelante. El citoplasma es hialino, de límites no siempre distinguibles. Tienen núcleo esférico central con cromatina finamente granulada y presencia de un nucleolo. Diámetro nuclear:  $7,41 \pm 1,30 \mu\text{m}$  ( $X \pm DS$ ). Figuras 19a y b.

**MET:** la microscopia electrónica demuestra claramente la unión entre SPG vecinas a través de puentes citoplasmáticos y de ahí su sincronización dentro del espermatocisto (Figura 19c). Poseen citoplasma con polisomas, presencia de cuerpos multilamelares, lisosomas, REL y aparato de Golgi prominente. Las mitocondrias son semejantes a las de las SPG A, pero en menor número. También se las encuentra asociadas a *nuages*. Núcleo esférico central con cromatina finamente granulada; nucleolo único con componente “granular” y “fibrilar” más electrodense. Figura 19c.

Las SPG A y B, representan la fase proliferativa o mitótica de la espermatogénesis.

**ESPERMATOCITO I (SPC I):** son células redondeadas. Su citoplasma, es hialino y no se observan límites celulares netos. Los núcleos son ovales y están caracterizados por la presencia de abundante cromatina irregularmente condensada en distintos estadios de la profase meiótica. Con H-E presentan un color violeta alilado. Diámetro nuclear:  $6,57 \pm 0,6 \mu\text{m}$  ( $X \pm DS$ ). Figuras 20 a y b.

**MET:** se observan puentes citoplasmáticos entre las células vecinas. Hay escasas mitocondrias con crestas lamelares, más pequeñas que en las SPG B y con matriz electrodensa. Las mitocondrias, redondas y cilíndricas, se encuentran asociadas a *nuages* hasta el estadio de paquitene. Se observan cuerpos multilamelares, REL, aparato de Golgi inconspicuo y próximos a él se encuentran los centriolos. El núcleo es más electrodense y presenta un nucleolo. Durante el estadio de paquitene, pueden observarse claramente los complejos sinaptonémicos. Figuras 20 c,d,e,f.

**ESPERMATOCITO II (SPC II):** es el estadio que se observa con menor frecuencia. Son de forma más oval y de menor tamaño que sus precursores inmediatos ya que se duplican en número. Por lo tanto el citoplasma se reduce y es poco visible. Núcleo voluminoso y esférico con cromatina más condensada y altamente teñida. Diámetro nuclear:  $4,75 \pm 1,02 \mu\text{m}$  ( $X \pm DS$ ). Figuras 20a y b.

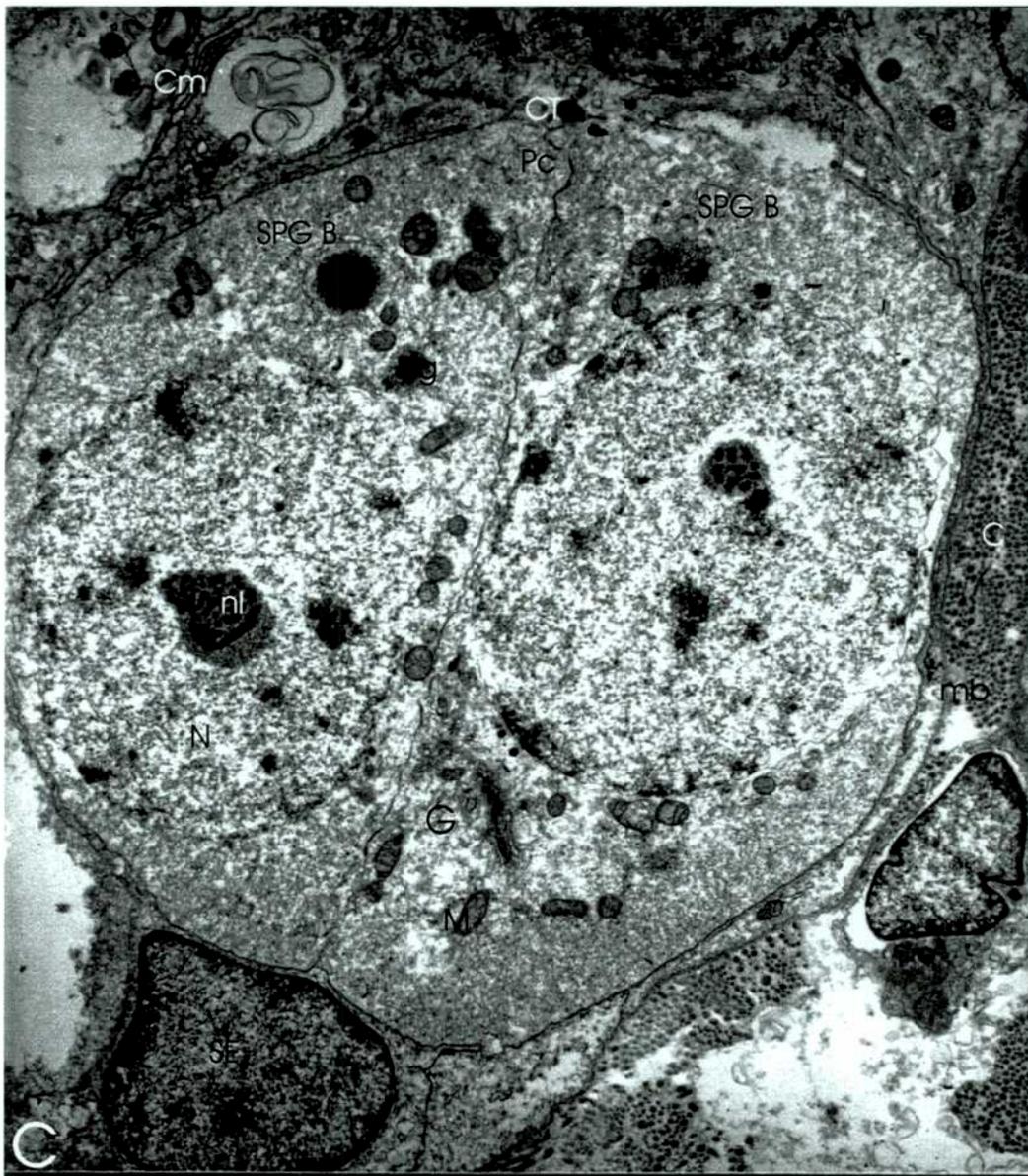
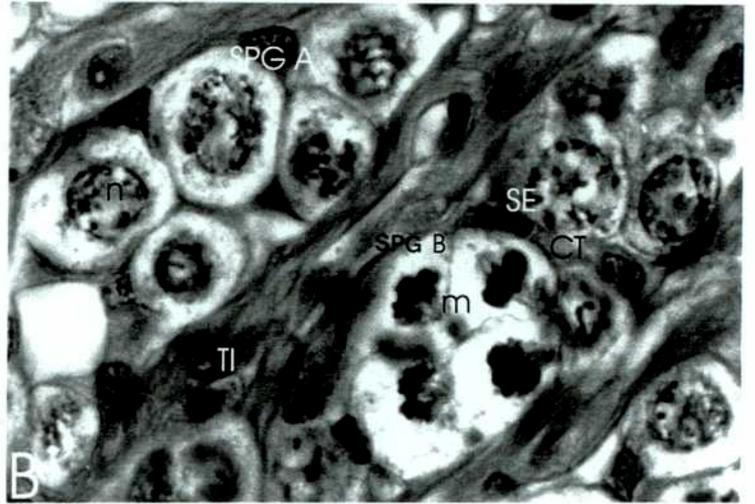
**Figura 19. Espermatogonia B.**

\* Microscopia óptica. **A)** Lóbulos testiculares conteniendo espermatogonias A y espermatocistos con espermatogonias B. Algunas de ellas en división. 200x. **B)** Detalle de espermatocisto conteniendo SPG en mitosis. 800 x. H- E ambas.

CT: espermatocisto; m: mitosis; n: núcleo; L: lóbulo; SE: núcleo de célula de Sertoli; Spg A: espermatogonias A; Spg B: espermatogonias B; TI: tejido intersticial.

\* Microscopia electrónica. **C)** Se observan 2 espermatogonias B rodeadas por 2 células de Sertoli, formando un espermatocisto. 3000x.

C: colágeno; Cm: cuerpo multilamelar; CT: espermatocisto, G: Aparato de Golgi, M: mitocondria, mb: membrana basal, n: núcleo, nl: nucleolo; Ng: nuages, Pc: puente citoplasmático; SE: núcleo de célula de Sertoli, Spg B: espermatogonia B.



**Figuras 20 y 21. Espermatocitos I y II.**

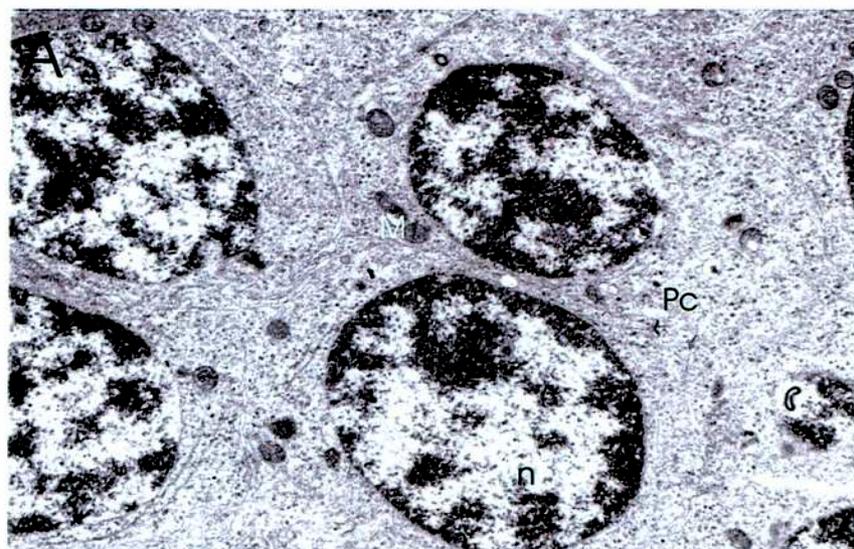
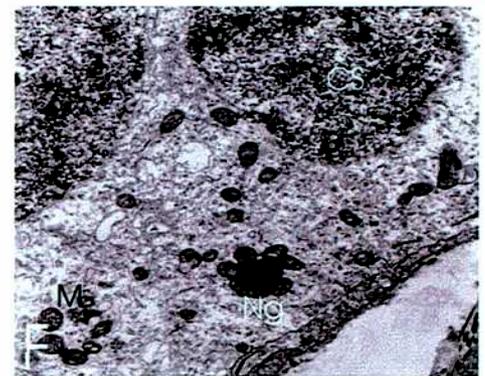
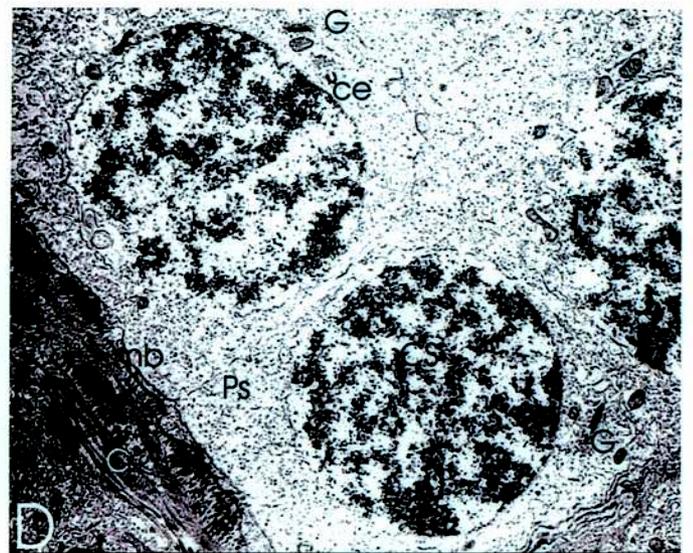
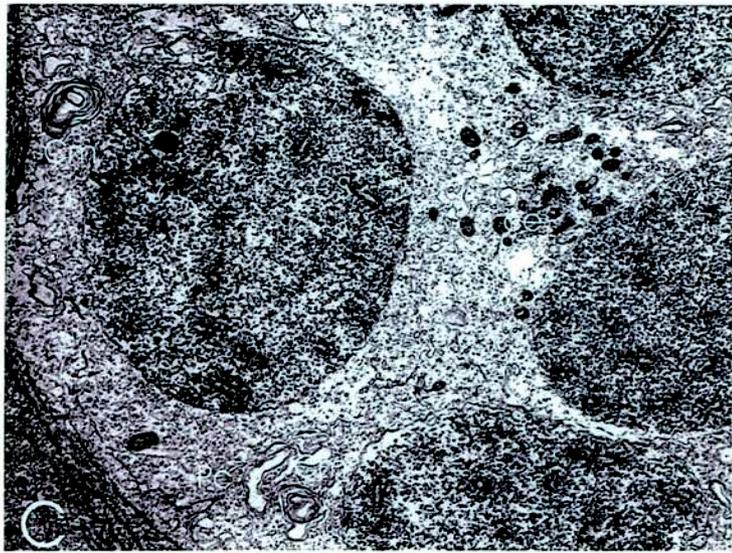
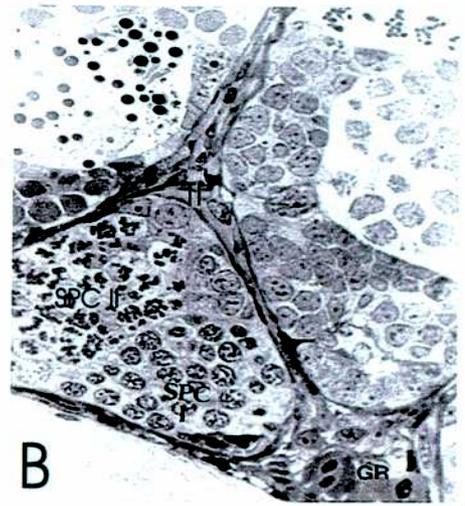
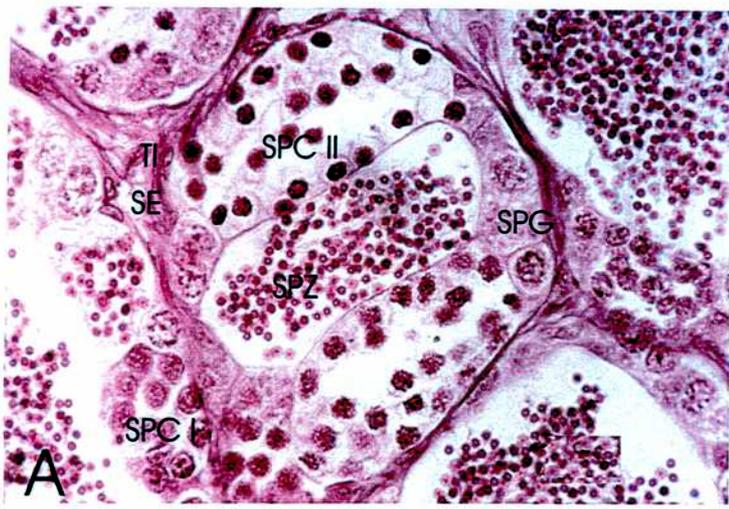
**20:** Microscopia óptica. **A)** Detalle de lóbulos testiculares conteniendo cistos en diferentes etapas de la espermatogénesis: SPG, SPC I, II y SPZ. H-E. 600x. **B)** Corte semifino. Se observan SPC I y II y glóbulos rojos dentro de un vaso.

GR: glóbulos rojos, Spg: espermatogonias, SE: núcleo de célula de Sertoli, SPC I: espermatocito I, SPC II: espermatocito II, SPZ: espermatozoide, TI: tejido intersticial.

\* Microscopia electrónica. **C)** y **D)** SPC I en paquitene. Se observan los complejos sinaptonémicos y centriolos. 3000x ambas. **E)** y **F)** Detalle de mitocondrias, nuages y aparato de Golgi. 12.000x y 5000x.

**21: A)** Microscopia electrónica. Detalle de espermatocitos II. Se observa un puente citoplasmático y un centriolo. 4400x.

C: colágeno, ce: centriolos, Cm: cuerpos multilamelares; CS: complejos sinaptonémicos, G: aparato de Golgi, M: mitocondria, mb: membrana basal, n: núcleo, Ng: nuages, Pc/Ps: puente citoplasmático.



**MET:** se observan puentes citoplasmáticos muy notorios. El citoplasma presenta mitocondrias pequeñas redondas, muy escasas, con crestas lamelares y matriz electrodensa, REL, aparato de Golgi y cuerpos multilamelares. El núcleo esta regularmente delineado con masas de cromatina densa y no se observa nucleolo. Cercanos al núcleo se observan los centriolos. Figura 21a.

**ESPERMÁTIDA (SPD):** duplican su número respecto del estadio previo. Se observa un importante remodelado y gradación de tamaños dentro del estadio a medida que avanza la espermiogénesis, perdiéndose hacia el final, los puentes citoplasmáticos. Los núcleos van reduciendo su tamaño y modificando su aspecto, debido a la condensación de la cromatina pero mantienen su forma esférica. Finalmente su aspecto es homogéneo. Diámetro nuclear inicial:  $2,8 \pm 0,42 \mu\text{m}$  ( $X \pm DS$ ). Figuras 24c y d.

**MET:** la transformación de espermatida en espermatozoide maduro (espermiogénesis), consiste en la reorganización del núcleo y del citoplasma, con pérdida de la mayor parte del último como “cuerpo residual”. Se observa un delineamiento de las células muy irregular y permanecen unidas por puentes citoplasmáticos. En las espermatidas tempranas, los núcleos presentan cromatina en distintos grados de condensación y las mitocondrias son escasas y globosas. A medida que avanza la transformación, el núcleo presenta cromatina granular. Las mitocondrias son muy escasas, globosas, con crestas lamelares y con matriz electrodensa y se desplazan hacia un polo de la célula. En el citoplasma se observa un aparato de Golgi bien desarrollado y ribosomas libres o formando polisomas. Los centriolos se ubican próximos a la membrana nuclear. La formación de los flagelos a partir de los centriolos, es previa al ordenamiento de las mitocondrias en la región que dará lugar a la “pieza media”. Como consecuencia de este ordenamiento, la SPD muestra una clara polaridad. Se observan desmosomas entre células de Sertoli correspondientes a dos espermatocistos con espermatidas. Figuras 22 y 23.

**ESPERMATOZOIDE (SPZ):** tienen la forma típica de los espermatozoides de peces con fecundación externa. Son las más pequeñas en el linaje de las células germinales. Con microscopia óptica se observan como pequeñas esferas con cromatina altamente condensada. En las gónada de animales maduros se los puede encontrar fácilmente dentro de los espermatocistos, en la luz que se forma en los lóbulos por la ruptura de los

**Figura 22. Espermatidas.**

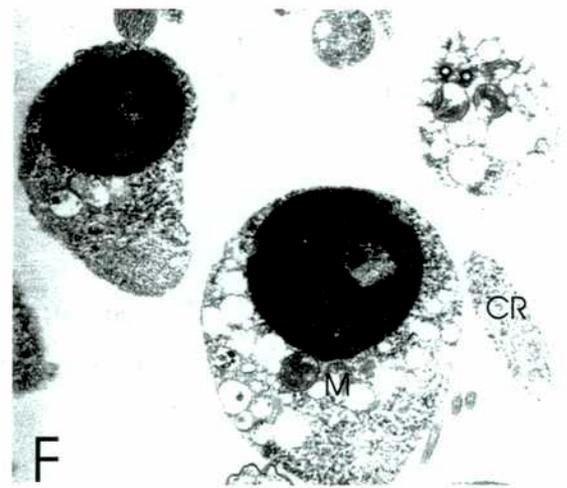
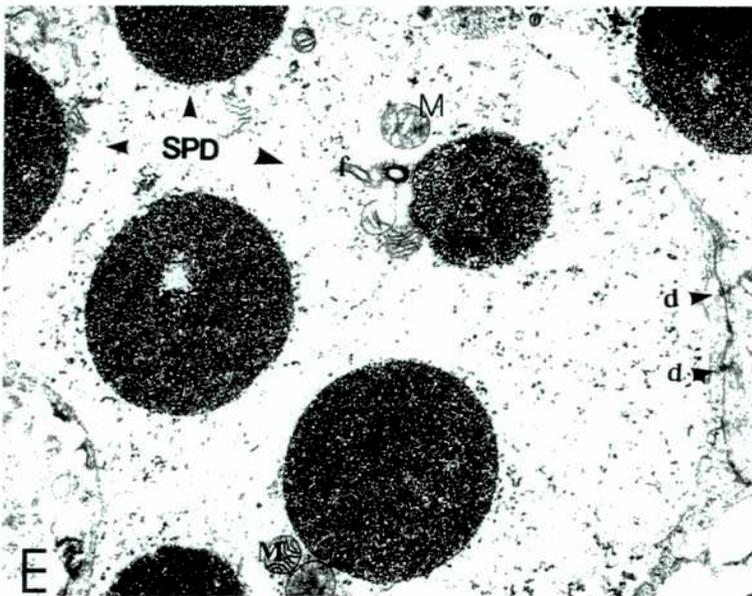
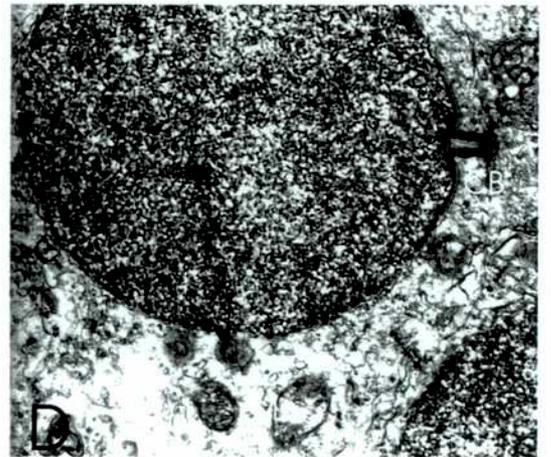
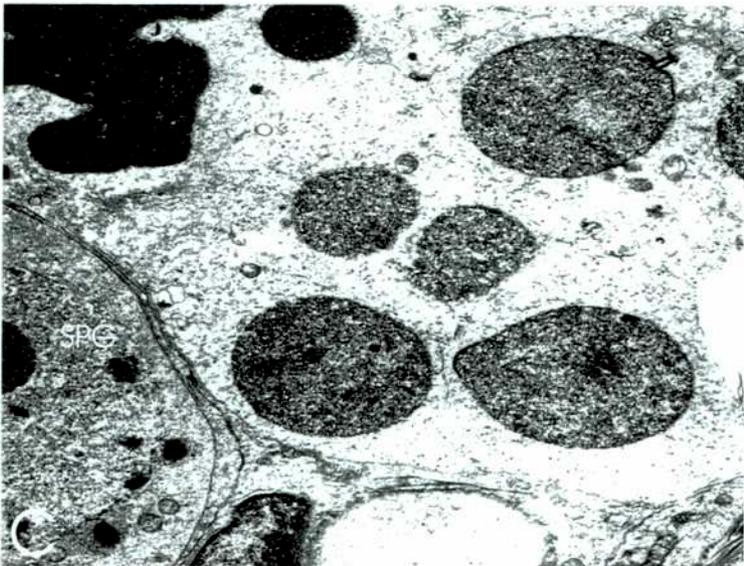
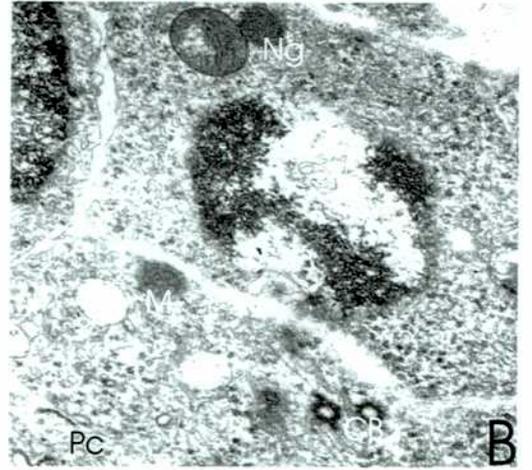
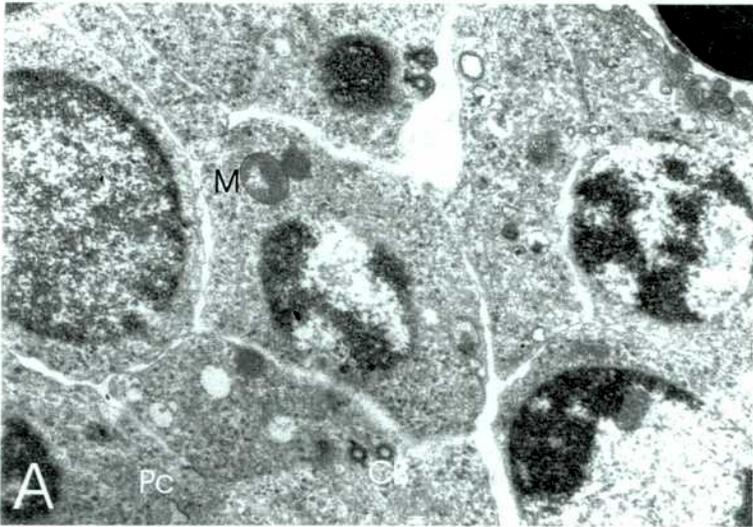
\* Microscopia electrónica. **A)** Vista general de espermatida temprana. Se observan los cuerpos basales y la disminución del número de mitocondrias. 4400x. **B)** detalle de una SPD temprana. Se observa un puente citoplasmático, cuerpos basales y nuages. 12000x **C)** Vista general de un espermatocisto con SPD, cuyos núcleos están en condensación media. Se observa el comienzo del desarrollo del flagelo. Se observa el cuerpo basal. 3000x. **D)** Detalle del cuerpo basal y del comienzo de la formación del flagelo. 12000x. **E)** Espermatocisto con SPD finales. El núcleo presenta cromatina altamente condensada. Se observan desmosomas entre células de Sertoli. 4400x. **F)** Espermatidas que han perdido los puentes citoplasmático. Se observan los cuerpos residuales. 3300x.

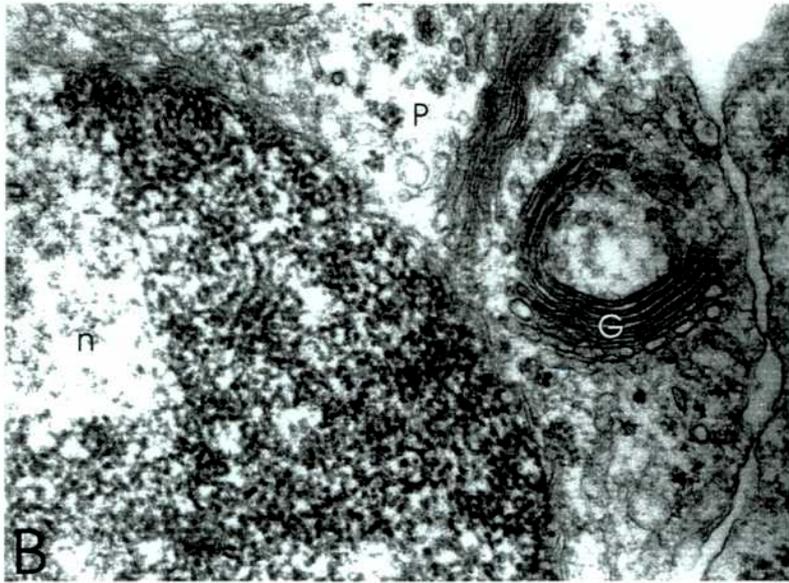
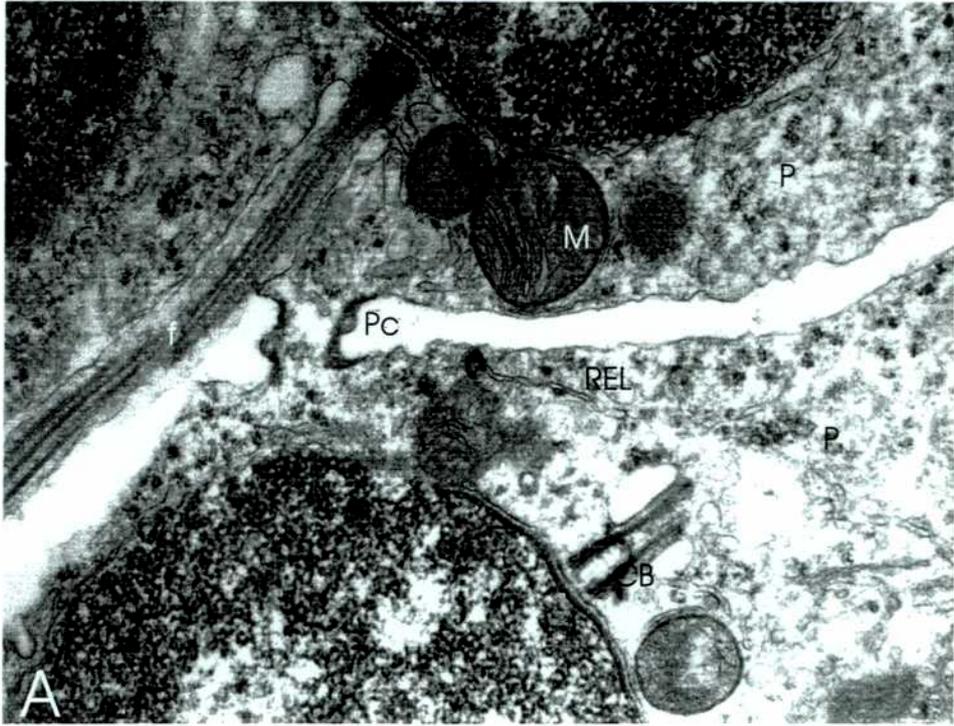
CB: cuerpo basal; cr: cuerpos residuales, d: desmosomas; M: mitocondria, ng: nuages; Pc: puentes citoplasmáticos; SPD: espermatidas.

**\* Figura 23. Espermatidas (cont.).**

**A)** Detalle de la formación del flagelo, aún se observan puentes citoplasmáticos entre las dos SPD. El citoplasma presenta REL y polisomas. Las mitocondrias están migrando hacia su posición definitiva. 12000x. **B)** Detalle de aparato de Golgi y polisomas. 20000x.

CB: cuerpo basal; G: aparato de Golgi, f: flagelo, M: mitocondria, P: polisomas; Pc: puentes citoplasmáticos; REL: retículo endoplasmático liso.





espermatocistos y en los conductos eferentes. Diámetro nuclear:  $1,8 \pm 0,37 \mu\text{m}$  ( $X \pm DS$ ). Figuras 24a,b,c y d.

**Con MET:** el SPZ maduro posee cabeza esférica sin acrosoma, núcleo con cromatina condensada y pequeñas áreas sin condensar. La “pieza media” es corta y esta constituida por dos cuerpos basales ubicados paralelamente entre sí y un anillo mitocondrial alrededor de ellos (de 4 a 6 mitocondrias). Estas son globosas, con crestas lamelares y matriz densa (Figuras 24e y 25a y b). Poseen dos flagelos, cada uno de ellos mide aproximadamente  $50 \mu\text{m}$  de largo (Figuras 25b y c). Cada axonema presenta un ordenamiento 9+2: nueve pares de microtúbulos periféricos y un par de túbulos centrales. Los nueve microtubúlos son continuos con los del cuerpo basal y el par central comienza por debajo de él (Figuras d y e). Carece de canal citoplasmático. No se observan asociaciones entre el espermatozoide y la célula de Sertoli. Es común encontrar cuerpos residuales en la luz de los lóbulos y en los conductos eferentes. Figuras 24 e y 25a,b,c y d.

**MES:** utilizando un testículo maduro, se logró observar gran cantidad de espermatozoides en la luz de los lóbulos, sus cabezas están dirigidas hacia el centro y sus colas hacia la pared del lóbulo (Figura 26c). Así mismo se corroboró la forma esférica de la cabeza así como una cantidad variable de mitocondrias globosas formando la pieza media. Figuras 26d y e.

**CÉLULA DE SERTOLI:** Están siempre presentes en el testículo. Se encuentran formando la pared del espermatocisto, apoyadas sobre la membrana basal que delimita al lóbulo testicular y adoptan la forma del espacio disponible. Lo más sobresaliente son sus núcleos pleomórficos (formas fusiforme o triangular). Los nucleolos son excéntricos. Tamaño nuclear:  $6,0$  a  $6,5 \mu\text{m}$ . Figuras 18a y b y 20a y b.

**MET:** Las células de Sertoli adyacentes se interdigitan unas con otras de manera compleja por lo tanto es difícil distinguir donde termina el citoplasma. Están conectadas por desmosomas (Figura 27a). Las uniones fuertes, (“tight junctions”) están localizadas cerca de la luz del lóbulo. Su citoplasma es escaso, rico en microfilamentos y se extiende envolviendo a las células germinales con pliegues tortuosos. El aparato de Golgi es evidente, los ribosomas están agrupados formando polisomas. Presencia de REL y RER, siendo el primero más abundante. Pocas mitocondrias, de matriz densa, donde se observan gránulos electrodensos (sales de calcio) entre las escasas crestas lamelares (Figura 27b). Se observan vesículas pinocíticas lo que estaría indicando una función de

**Figura 24. Espermatozoides.**

\* Microscopia óptica. **A)** Muestra de semen obtenido por masaje abdominal. Se observa la presencia de dos flagelos y la autofluorescencia de las células al ser excitadas con luz UV. 200x. **B)** Corte semifino de la misma muestra. Nótese la longitud de los flagelos. 200x. **C)** Detalle de lóbulos con SPZ en espermaticitos y en la luz. 600x. **D)** Corte semifino de un lóbulo conteniendo espermaticitos, con diferentes estadios de la espermatogénesis. 200x.

ca: cabeza del espermatozoide; f: flagelo; SPC: espermaticitos, SPD: espermátidas, SPZ: espermatozoides.

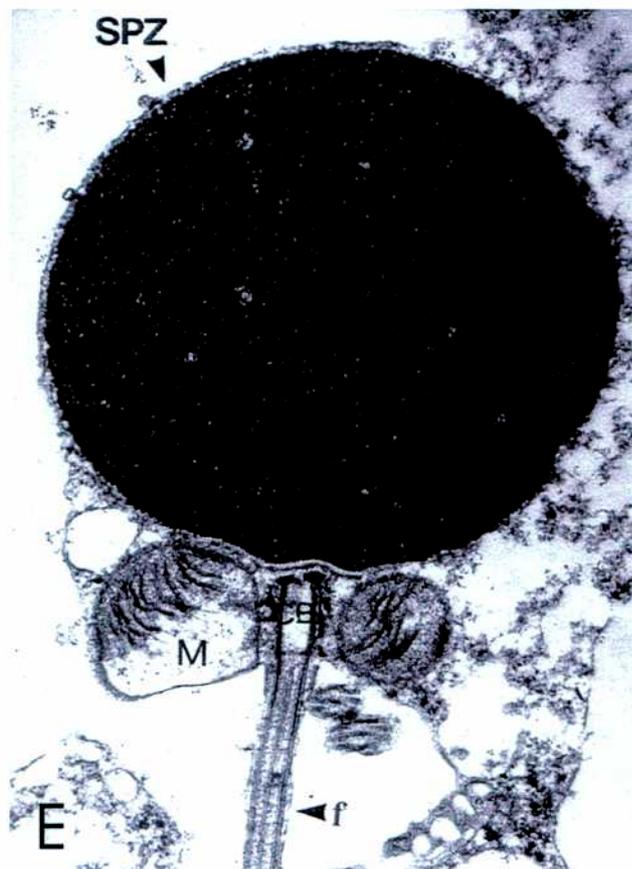
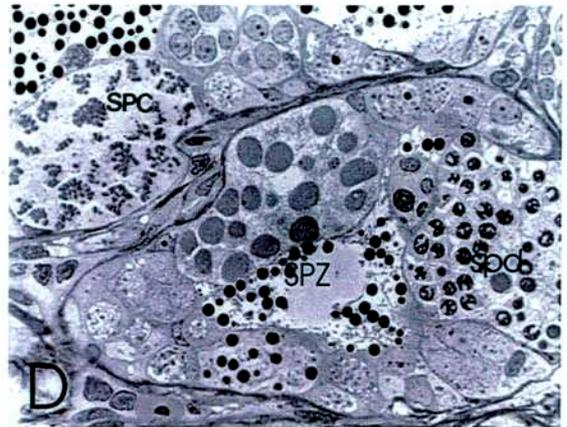
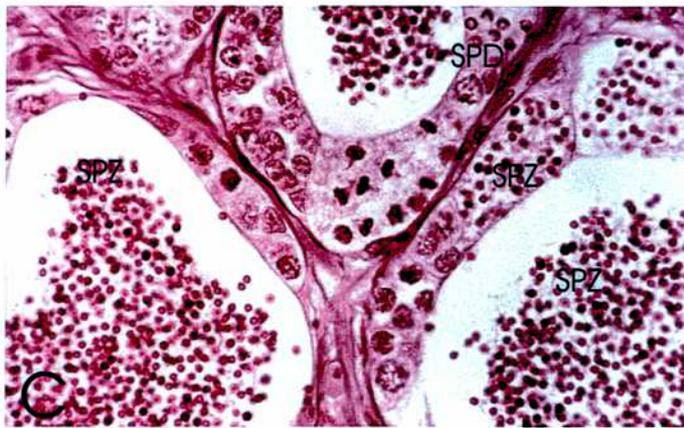
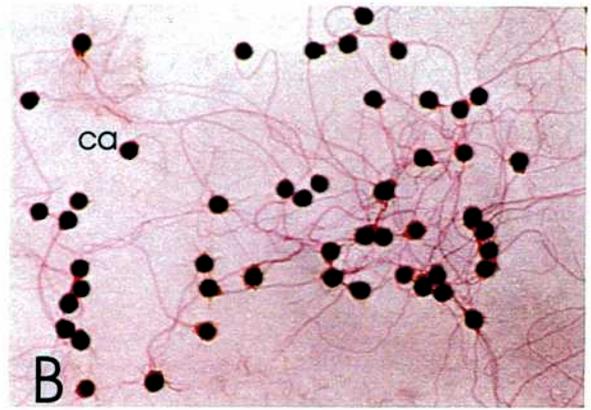
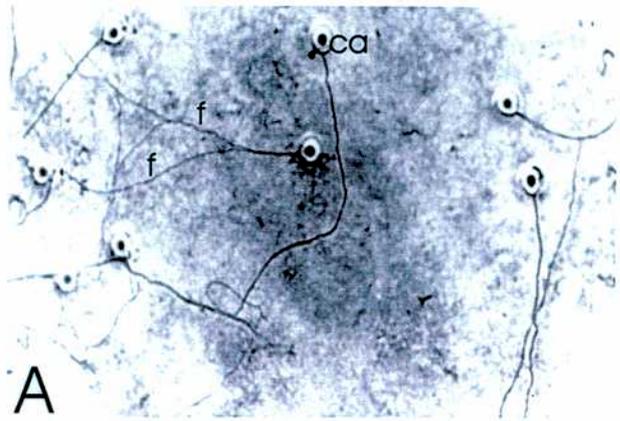
\* Microscopia electrónica. **E)** Aspecto general de la cabeza, pieza media y región proximal del flagelo. 12000x.

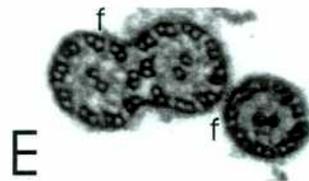
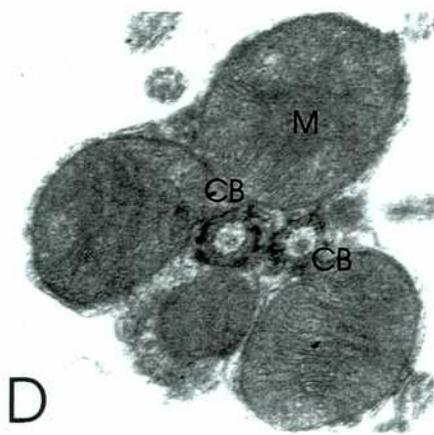
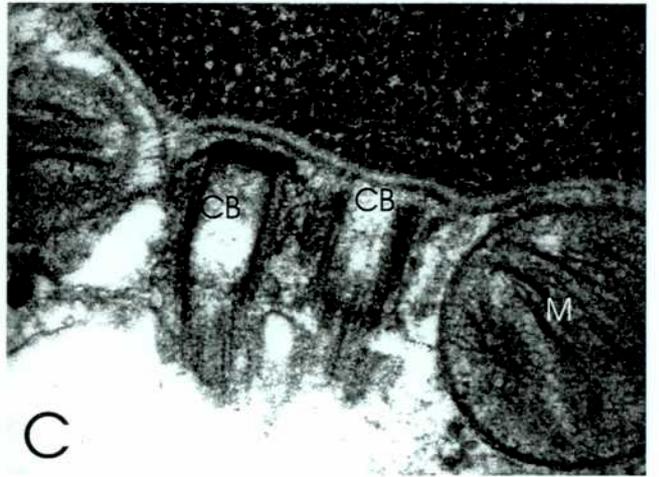
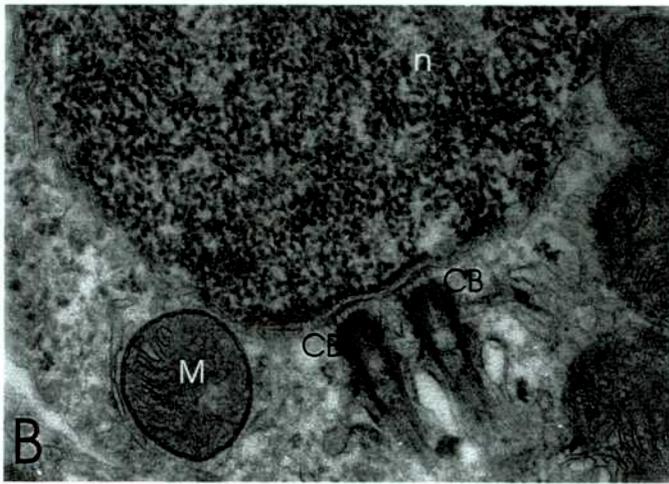
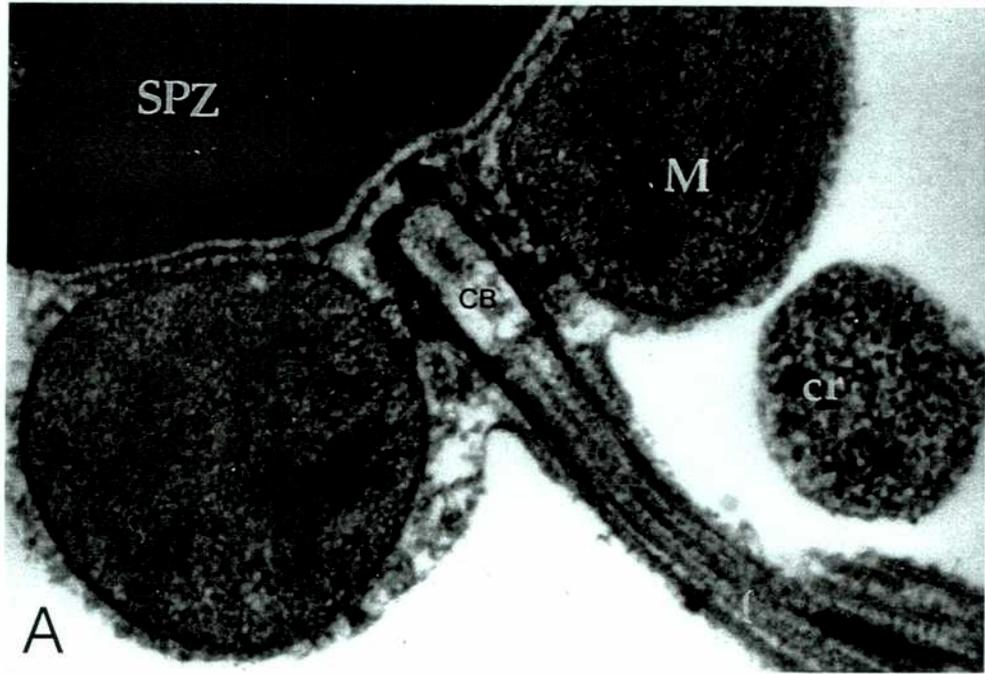
CB: cuerpo basal, f: flagelo, M: mitocondria, SPZ: espermatozoide.

**Figura 25. Espermatozoides (cont.)**

\* Microscopia electrónica. **A)** Detalle de la pieza media, donde se observa el cuerpo basal y las mitocondrias. 30000x. **B)** y **C)** Detalle de los cuerpos basales, evidenciando la biflagelaridad 50000x y 20000x respectivamente. **D)** Corte a la altura de la pieza media, mostrando los cuerpos basales y el anillo mitocondrial. 20000x. **E)** Corte de los flagelos, donde se observa la estructura 9+2 microtúbulos del axonema. 50000x.

CB: cuerpo basal, cr: cuerpos residuales, f: flagelo, M: mitocondria, n: núcleo; SPZ: espermatozoide.

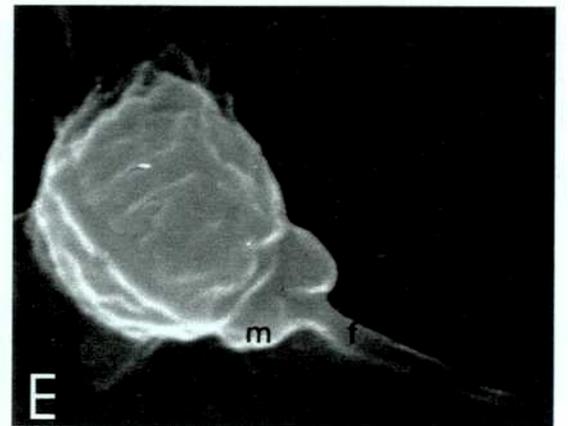
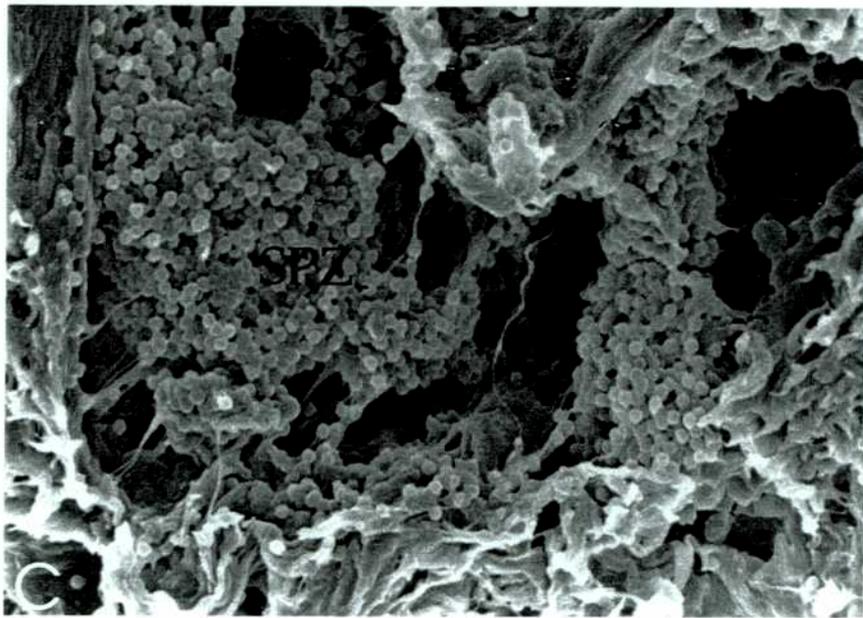
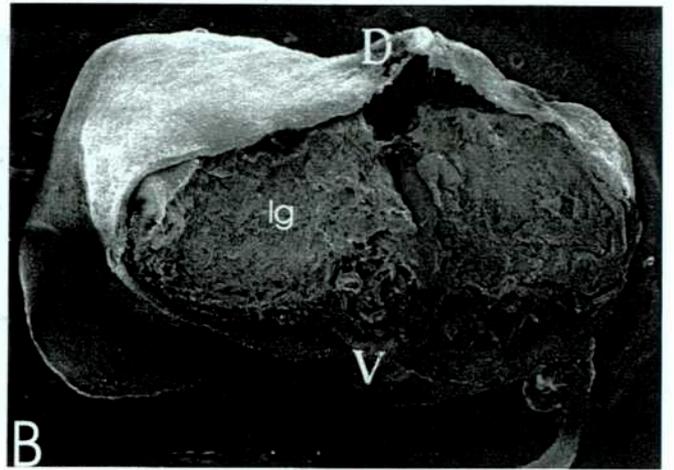
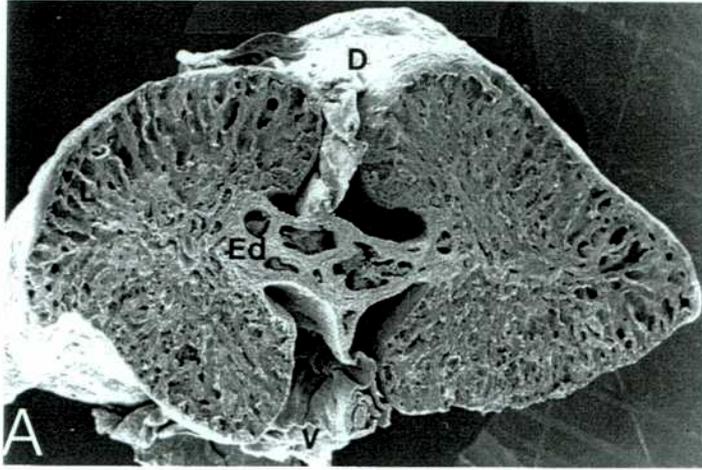




**Figura 26. Microscopia electrónica de barrido.**

**A)** Aspecto general del testículo de un macho primario. 30x. **B)** Aspecto general del testículo de un macho secundario. 45x. **C)** Detalle del lóbulo testicular de un macho maduro. 700x. **D)** 10.000x y **E)** 15.000x. Ambas son detalle de espermatozoides. Se observa la forma esférica de la cabeza y las mitocondrias.

D: dorsal, Ed: conductos eferentes, f: flagelo, lg: lamela gonadal, m: mitocondria, SPZ: espermatozoides; V: ventral.



nutrición. Poros nucleares conspicuos. Tienen función fagocítica, esto puede observarse por la presencia de grandes vacuolas en su citoplasma. Figuras 27a, b y c.

## **B) COMPARTIMIENTO INTERSTICIAL**

El compartimiento intersticial se encuentra entre los lóbulos y está constituido por células de Leydig (o intersticiales), fibras colágenas, células mioides y vasos sanguíneos.

En los testículos en cualquier etapa de la espermatogénesis, el tejido intersticial ocupa un volumen relativamente pequeño comparado con aquel del compartimiento germinal. Los espacios interlobulares son estrechos pero en las zonas angulares ubicadas entre tres o cuatro lóbulos se encuentra mayor número de células, muchas veces asociadas a vasos sanguíneos. Figura 18a.

**CELULAS DE LEYDIG:** Se las observa todo el año pero más fácilmente en los animales de baja actividad reproductiva debido al poco desarrollo de los lóbulos y al espacio que se genera entre los mismos. Poseen forma esférica u oval. Con núcleo de igual forma, cromatina puntillada y nucleolo único. Tamaño nuclear (eje mayor): 5,3 a 5,9  $\mu\text{m}$ . Figura 18a.

**MET:** El citoplasma posee numerosas mitocondrias con crestas tubulares y matriz electrodensa con gránulos de sales de calcio. El REL es vesicular y muy abundante, el aparato de Golgi, está constituido por varias pilas de cisternas, se observan escasos lisosomas y cuerpos multilamelares. Los desmosomas las unen entre sí y a las células mioides. Núcleos con nucleolo excéntrico, cromatina puntillada y poros nucleares fácilmente observables. Entre las células de Leydig se observan paquetes de fibras colágenas. Figuras 28a, b y c.

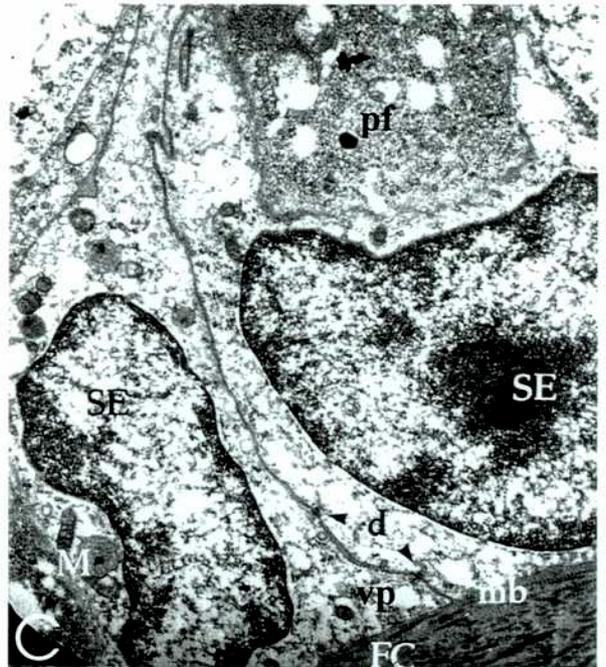
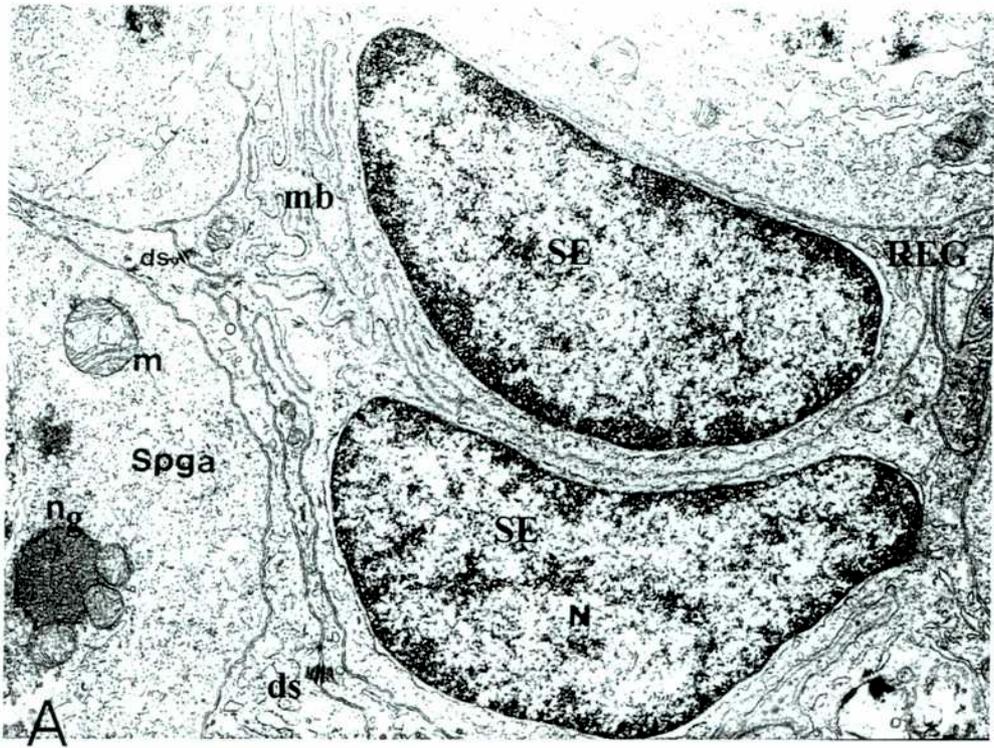
**CELULAS MIOIDES:** forma variable, desde fusiformes hasta ligeramente ovaladas. Núcleo elongado u ovoide con indentaciones. Tamaño nuclear: 9,5 a 10,5  $\mu\text{m}$  en corte longitudinal.

**MET:** Se encuentran rodeadas por abundantes fibras colágenas. La membrana citoplasmática de la célula mioide está unida -zonas de adhesión o de contacto- a las fibras colágenas y además se asocian entre sí por desmosomas. El citoplasma presenta organelas que se ubican en el espacio disponible en los extremos del mismo: mitocondrias pequeñas y escasas, REL, gran cantidad de ribosomas asociados a la

**Figura 27. Células de Sertoli.**

\* Microscopia electrónica. **A)** Aspecto de dos células de Sertoli y sus procesos. Se denota lo tortuoso de sus pliegues citoplasmáticos, los desmosomas que las unen y la membrana basal. 7000x. **B)** Detalle de una célula de Sertoli, mostrando el aparato de Golgi y mitocondrias con partículas de sales de calcio. 12000x **C)** Célula de Sertoli en proceso fagocítico, se observa un cuerpo residual en su citoplasma y vesículas pinocíticas en los límites de la célula. 7000x.

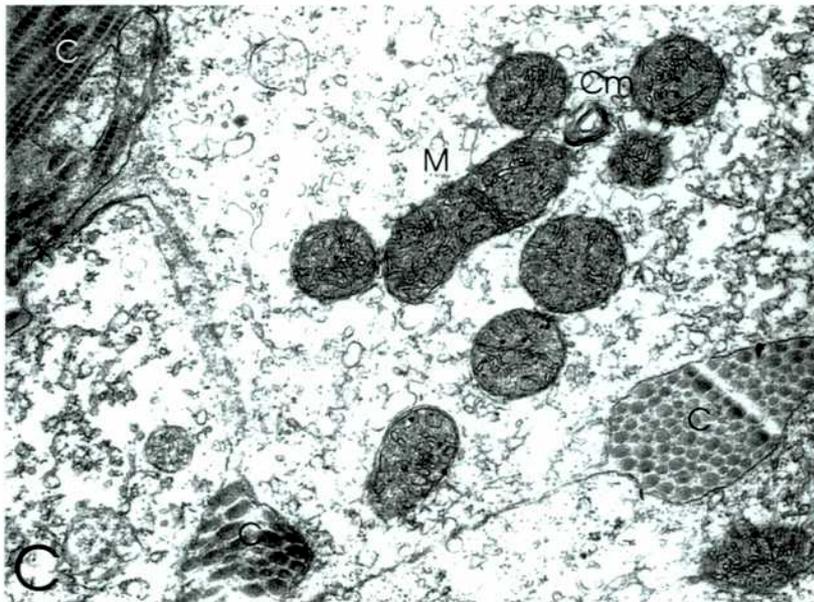
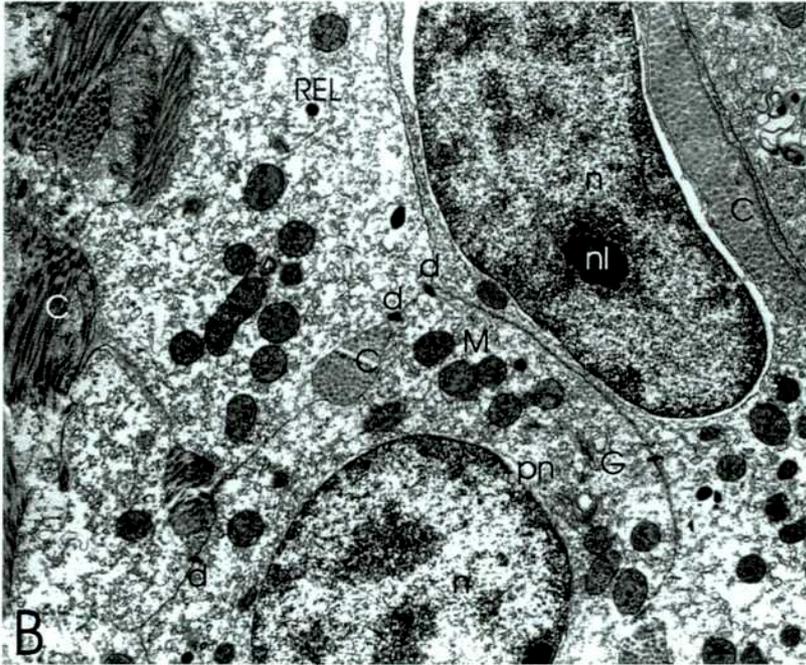
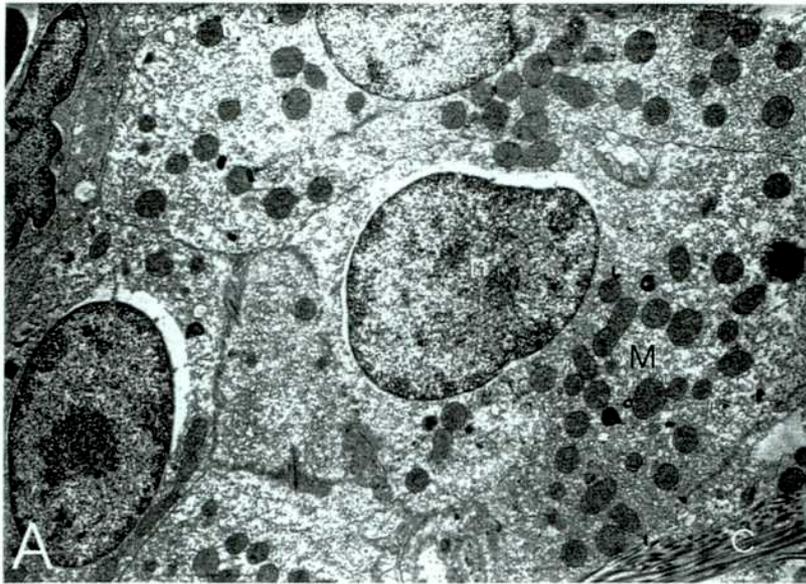
FC: fibras colágenas; ds/d: desmosoma; G: Aparato de Golgi; m: mitocondria; mb: membrana basal; ml: cuerpos multilamelares; N: núcleo; Ng: nuages; pf: proceso fagocítico; REG: retículo endoplásmico rugoso; SE: núcleo de célula de Sertoli; SPG a: espermatogonia A; vp: vesículas pinocíticas.



**Figura 28. Células de Leydig.**

\* Microscopia electrónica. **A)** Aspecto de varias células de Leydig dentro del compartimiento intersticial. 3000x. **B)** Detalle de las células de Leydig, mostrando mitocondrias, REL, aparato de Golgi, desmosomas, núcleo, nucleolo y poros nucleares conspicuos. Nótese la abundancia de fibras colágenas en corte longitudinal y transversal. 4400x. **C)** Magnificación de las mitocondrias típicas de este tipo celular. En cualquier época del año, presentan crestas tubulares y gránulos de sales de calcio. Se observa un cuerpo multilamelar y fibras colágenas. 12000x.

C: fibras colágenas; Cm: cuerpos multilamelares; d: desmosoma; G: aparato de Golgi; M: mitocondria; n: núcleo; nl: nucleolo; LE: núcleo de célula de Leydig; pn: poros nucleares; REL: retículo endoplásmico liso.



membrana nuclear y vesículas pinocíticas. Los microfilamentos corren paralelos al eje mayor de la célula . Se observan perigránulos de heterocromatina dentro del núcleo. Figuras 29a, b y c.

**FIBRAS COLÁGENAS:** están presentes en todo el tejido orientadas tanto en forma transversal como longitudinal. Se colorean intensamente con Tricrómico de Masson. Figura 18a.

**MET:** Presentan bandas claras y oscuras perpendiculares al eje mayor de la fibra. Poseen zonas de adhesión o de contacto a la membrana de las células mioides. Figuras 29b y c.

Entre las fibras colágenas, se observan figuras mielínicas conteniendo vesículas claras, intermedias y electrodensas (terminales nerviosas). Figura 30a. En la proximidad de los vasos sanguíneos se encuentran **granulocitos**. Poseen núcleo con cromatina más densa en la periferia. Su citoplasma presenta gránulos de forma heterogénea, de diferentes electrodensidades, pero de contenido homogéneo. Figuras 30b y c.

**CONDUCTO EFERENTE:** posee un epitelio simple cuyas células varían de plano a cúbico de acuerdo con la etapa de la espermatogénesis. Poseen núcleo ovalado, microvellosidades y nucleolo único. Estas células presentan mitocondrias, abundantes microfilamentos y polisomas. Se observan numerosas vesículas pinocíticas. Las uniones son de tipo “zonula occludens” en la región próxima a la luz que funcionarían a modo de barrera testicular. Están asociadas entre ellas por desmosomas. Están rodeados por células mioides y abundantes fibras colágenas. Figuras 31 y 32.

**Figura 29. Células mioides.**

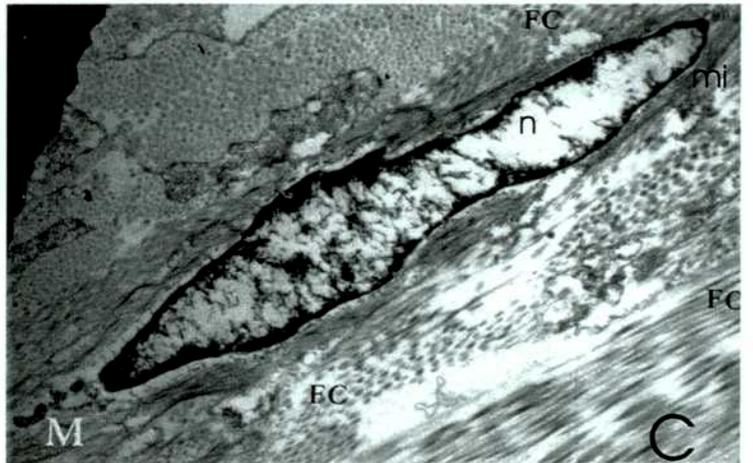
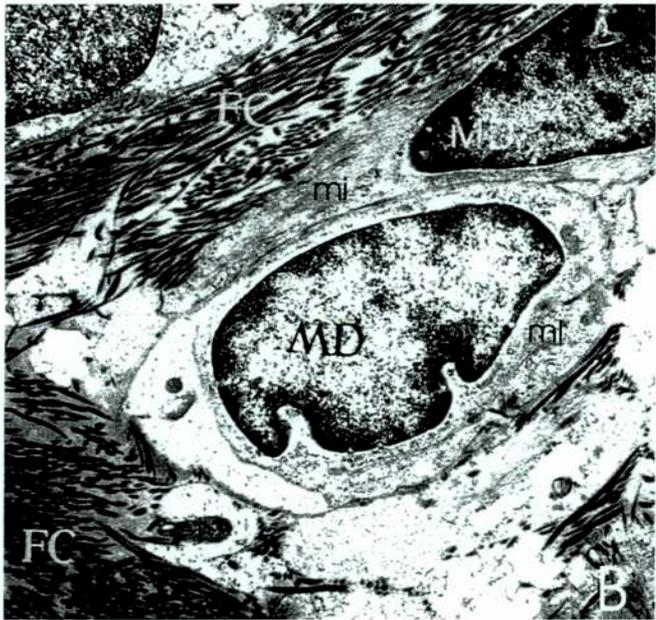
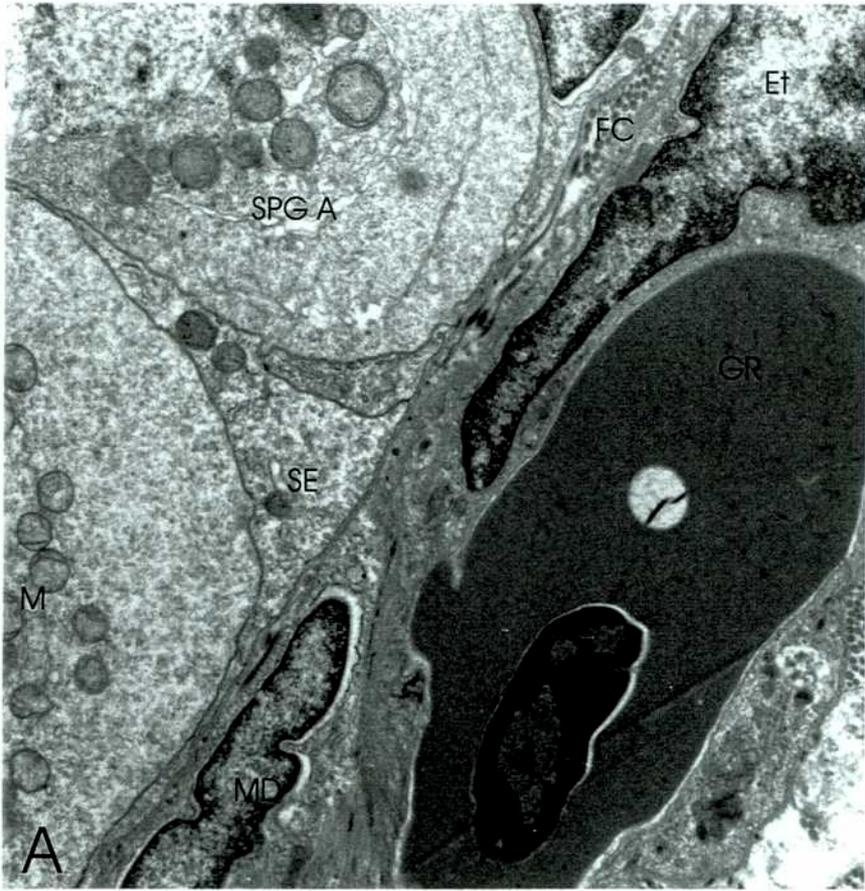
\* Microscopia electrónica. **A)** Ubicación de las células mioides en el compartimiento intersticial. 5000x. **B)** Corte transversal. Se observa que están inmersas en fibras colágenas y poseen microfilamentos que se ven como un fino puntillado. 4400x. **C)** Corte longitudinal. Nótese los microfilamentos, la ubicación de las mitocondrias y las fibras colágenas que la rodean. 4400x.

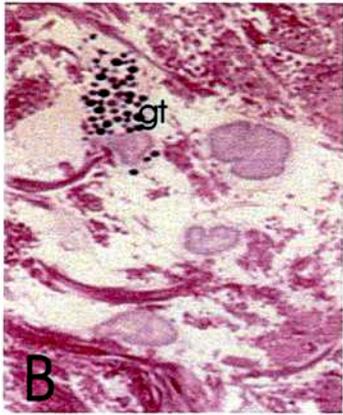
Et: célula endotelial; FC: fibras colágenas; GR: glóbulo rojo; M: mitocondria, MD: célula mioide; mi: microfilamentos; n: núcleo, SE: células de Sertoli; SPG A: espermatogonia A.

**Figura 30.**

\* Microscopia electrónica. **A)** Figuras mielínicas encontradas en el tejido intersticial entre las fibras colágenas. 20000x. **B)** Semifino de la zona mostrando el aspecto de un granulocito. 3000x. **C)** Granulocito conteniendo gránulos de diferente electrodensidad, encontrado cerca de un vaso sanguíneo. Semifino 3000x.

C: fibras colágenas; g: gránulos, gt: granulocitos; n: núcleo; v: vesículas



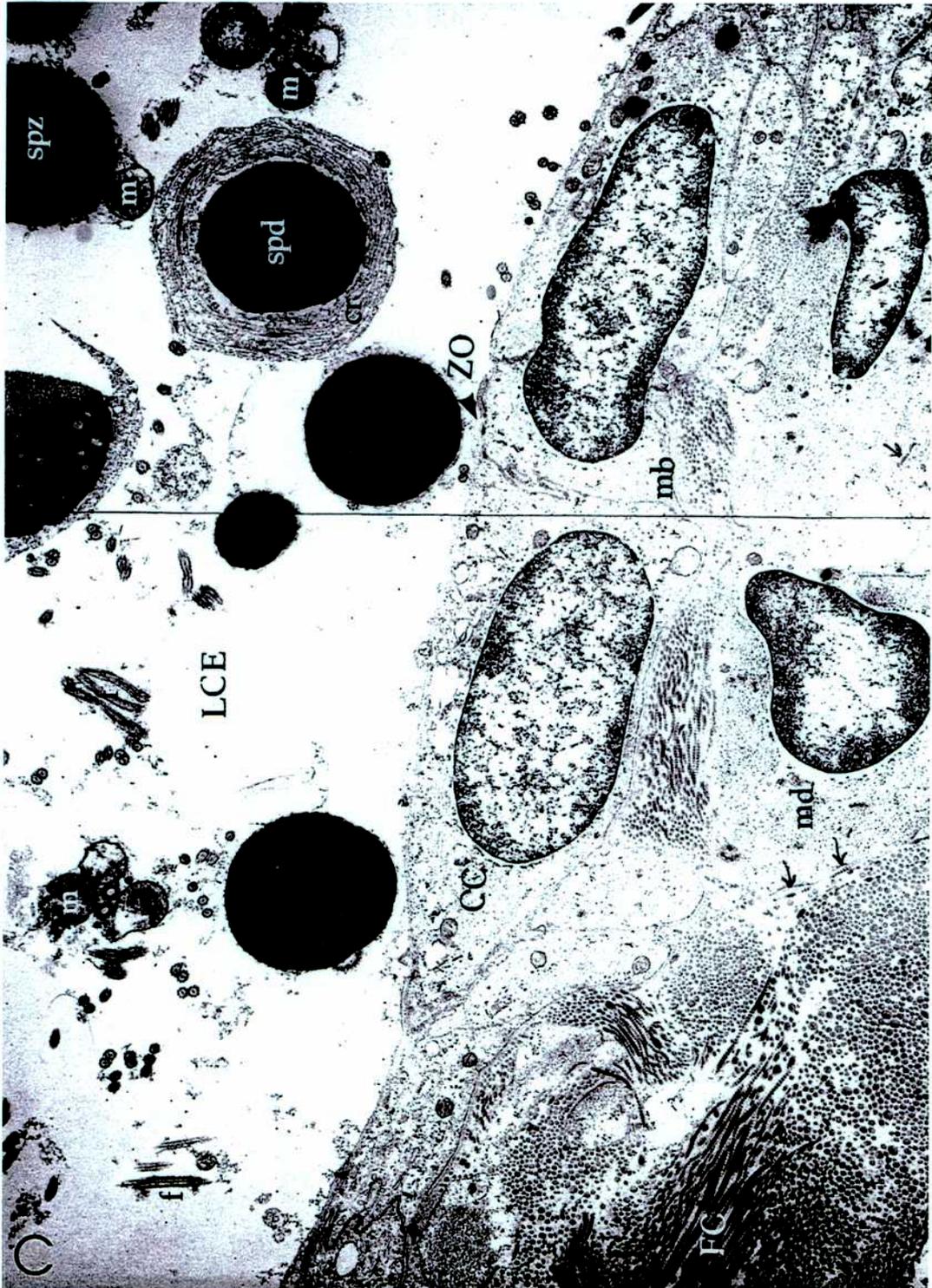
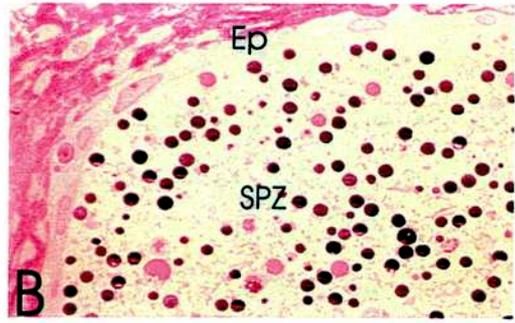
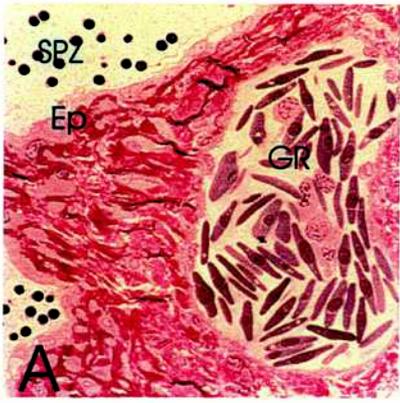


**Figura 31. Conducto eferente.**

A) y B) Cortes semifinos de conductos eferentes conteniendo SPZ en la luz. Nótese el tipo de epitelio cúbico. 200x. Ep. Epitelio; GR: glóbulos rojos; SPZ: espermatozoides.

C) Las células del conducto eferente presentan desmosomas y *Zonulas occludens*. Apoyan sobre una membrana basal que la separa de las fibras colágenas. En la luz del conducto se observan SPZ, SPD y numerosos cortes de flagelos. 3000x.

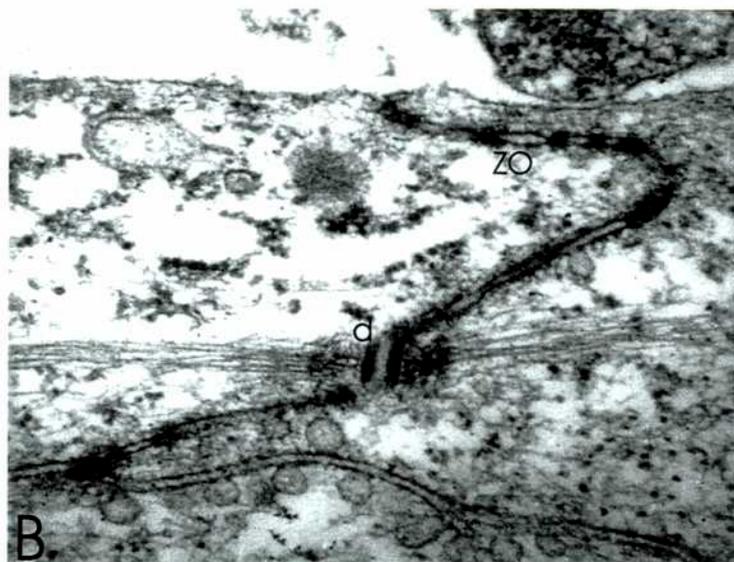
CC: célula del conducto; d: desmosoma; f: flagelo; FC: fibras colágenas; M: mitocondria; mb: membrana basal; md: célula mioide; n: núcleo; LCE: luz del conducto eferente; SPG A: espermatogonia A; SPD: espermátida; SPZ: espermatozoides; ZO: *Zonula occludens*.



**Figura 32. Conducto eferente (cont.)**

**A)** Detalles de la región de las uniones impermeables entre dos células del conducto que dan a la luz. 12000x. **B)** Magnificación de las uniones impermeables y adherentes (d). Se observan los filamentos de actina que forman el desmosoma. 30000x.

C: colágeno, d: desmosoma, n: núcleo; ZO: *zonula occludens*



## CONCLUSIONES y DISCUSIÓN

*S. marmoratus* presenta machos primarios y secundarios, por lo tanto es protogínica diándrica para las zonas muestreadas y no monándrica como había sido determinado por Liem (1968) para Argentina. La población de machos estuvo formada por 20% de primarios y 80% de secundarios. Los machos primarios presentaron un rango mayor de tamaño, variando entre 13 y 88 cm de longitud total. No se capturaron animales de menor tamaño debido probablemente a las técnicas utilizadas. Liem (1968) no encontró machos primarios en Argentina tal vez debido a la baja proporción de estos en la población estudiada y el tamaño insuficiente del muestreo.

Los machos secundarios presentaron una variación de tamaños entre 56 y 91 cm. Este hecho, la organización lamelar de la gónada, la persistencia de una cavidad pseudovárica, una cavidad ovárica y una cápsula ovárica primaria, así como la existencia de individuos hermafroditas entre los 45 y 60 cm de longitud total, demuestran que los machos secundarios provienen de la reversión sexual de hembras funcionales. Parecería que *S. marmoratus* posee un proceso de reversión del sexo similar al de los Serránidos, específicamente, el black sea bass (besugo) *Centropristis striata* (Cochran y Grier, 1991), pese a que estos dos grupos de peces pertenecen a Ordenes distintos.

La estructura testicular de los machos primarios coincide con la del tipo lobular irrestricto (Grier, 1993) donde los lóbulos apoyan sobre una cápsula testicular ubicada en la periferia del mismo y los espermatocistos con los diferentes estadios se encuentran a cualquier altura del mismo. El testículo de los machos secundarios es también de tipo lobular irrestricto pero en este caso los lóbulos se desarrollan en la lamela ovárica primaria y presentan escaso tejido conectivo en la periferia testicular.

Según Sadovy & Shapiro (1987), los conductos eferentes en los machos secundarios se desarrollan en la cápsula ovárica. En trabajos previos, Liem (1968) encontró que la cavidad pseudovárica era retenida en los machos secundarios pero parecía no ser funcional. Los espermatozoides son liberados en las cavidades ováricas primarias correspondientes a la fase de hembra pero nunca en la cavidad pseudovárica. Posteriormente, la cavidad ovárica se fusiona para formar un vaso deferente (Liem, 1968). Este no es el caso para la población estudiada de *S. marmoratus* donde los espermatozoides son liberados a un nuevo sistema de conductos eferentes que se desarrollan en el tejido conectivo de neoformación ubicado en la región ventral de la lamela gonadal y en los

sostenes laterales que la unen a la vaina. Además, los conductos eferentes posteriores se abren directamente en el conducto urinario mientras que los de la región anterior, vierten su contenido en un conducto colector intratesticular que también desemboca en el urinario, dando lugar finalmente a un conducto urogenital común que se abre en la papila.

El macho primario posee un testículo bilobulado y en el centro pueden observarse, los conductos eferentes. Liem (1968) encontró que en los testículos bilobulados de *S. marmoratus*, los espermatozoides de ambos lóbulos eran colectados en dos conductos en vez de 10 a 12 como lo es para la especie de Argentina. Éstos se unen en la región posterior del testículo formando el conducto deferente, el cual se une al urinario para formar un conducto urogenital común que se abre en la papila urogenital.

La liberación del espermatozoide desde los espermatocitos durante la espermiación, es un proceso complicado debido a que los lóbulos poseen una luz cerrada y no continua con los conductos eferentes. Sin embargo, durante este proceso, los lóbulos se anastomosan entre sí, abriendo un camino para la salida del espermatozoide. El epitelio de los conductos eferentes posee células con características muy semejantes a las de Sertoli, las cuales están unidas por desmosomas y uniones estrechas. Esto estaría indicando una posible función de barrera hematotesticular o Sertoliana.

La unidad de estructura y función en ambos tipos de machos es el espermatocito el cual está constituido por células germinales y de Sertoli.

Los centros melanomacrofágicos fueron encontrados en los revertantes, en machos secundarios y primarios. El número y tamaño de los centros varió a lo largo del año, siendo mayor en los períodos postreproductivos. Esto sugiere que estos centros podrían ser más activos en estos períodos degradando células residuales del ciclo espermatogénico, en especial espermatozoides. Una situación similar se observa en las hembras y los revertantes donde los centros podrían estar ayudando en la fagocitosis de tejido femenino, permitiendo así la eliminación del mismo durante el cambio de sexo (Ravaglia y Maggese, 1995; Ravaglia, 2000). Estos autores sugieren que las estructuras encontradas en las gónadas, poseen las mismas características y funciones de aquellas encontradas en hígado o bazo y que podrían actuar como eliminadores de células residuales o atrésicas, espermatozoides en degeneración y parásitos.

Según la clasificación de Sadovy y Shapiro (1987), la gónada de *S. marmoratus* durante la reversión es “no limitada tipo I”, donde el tejido masculino y femenino están en contacto pero no se mezclan.

El IGS de ambos tipos de machos es más alto durante el verano, pese a que el de los machos primarios es mucho mayor. Los machos secundarios aumentan su IGS a medida que procede su nuevo estatus sexual. Probablemente estén necesitando un periodo de tiempo mayor en dicho estatus para poder adaptarse y ser capaces entonces de aumentar su producción de semen. Sería muy interesante poder medir la producción de semen en ambos tipos de machos a fin de determinar si existen diferencias en el volumen o en la concentración.

La ausencia de individuos transicionales durante el otoño puede deberse al hecho que las hembras presentan signos de madurez al final del verano. Durante el otoño están en el periodo de postpuesta y probablemente no han iniciado su reversión o esta no es conspicua. La presencia de espermatogonias sin la existencia de estadios de la espermatogénesis más tardíos, no es un indicador de la reversión sexual dado que ellas no pueden ser fácilmente distinguidas de las oogonias. Los individuos intersexo son muy comúnmente encontrados en las de colecciones de campo. El porcentaje más alto de estos individuos registrados en la literatura fue de un 20% en *Gonostoma gracile* (Kawaguchi y Marumo, 1967) y en *S. marmoratus* (Liem, 1968). En este estudio fue de un 9.8%.

El valor adaptativo de la reversión del sexo y el éxito sexual permanecen bajo hipótesis. Según Liem (1968), la respiración aérea de los Synbranchiformes les permite ocupar arroyos y pantanos que están sujetos a sequías periódicas durante las cuales estos individuos permanecen aislados. Este tipo de hermafroditismo protogínico les permitiría establecer nuevas colonias mas fácilmente que en aquellas especies gonocóricas, las cuales tendrían muy baja probabilidad de encuentro entre machos y hembras bajo estas condiciones. La protoginia propiamente dicha, podría estar evolucionando para compensar las restricciones producidas por las sequías. Una de las características del desarrollo sexual de los teleósteos es justamente su plasticidad y esto puede observarse desde la bipotencialidad de su gónada (Francis, 1992). Tal vez, la diferenciación sexual no es iniciada por un cambio que actúa directamente sobre la gónada sino más bien por un evento que se inicia en el cerebro. Este cambio al menos está potencialmente sujeto a influencias ambientales, aún en especies con cromosomas sexuales.

Se caracterizaron los distintos estadios de la espermatogénesis, las células de Sertoli e intersticiales, no encontrándose diferencias entre machos primarios y secundarios a nivel electrónico.

Se ha logrado observar claramente la existencia de puentes citoplasmáticos desde SPG B hasta SPD tardía, así como la presencia de desmosomas entre las células de Sertoli de un mismo espermatocisto y entre distintos espermatocistos.

Las mitocondrias varían en tamaño, número y densidad electrónica desde espermatogonia A hasta spz y siempre presentan crestas de tipo lamelar.

En las SPG A, B y SPC I, la presencia de cuerpos densos o “nuages”, asociadas a mitocondrias, indicarían actividad sintética de la célula. En *Oryzias latipes* estas organelas han sido observadas exclusivamente en SPG A y B (Hamaguchi, 1993).

Probablemente la vida media del SPC II sea corta, debido a que son difíciles de encontrar y es posible que pasen muy rápidamente a formar espermátidas.

Un tipo primitivo de SPZ es retenido en esta especie donde la fecundación es externa. La forma redonda de la cabeza y la ausencia de acrosoma, coincide con la presencia de micropilo en el oocito (Ravaglia, 2000). Presenta dos flagelos al igual que otros Ordenes de peces (ejemplo: Siluriformes, *Ictalurus punctatus* y *Rhamdia sapo*, entre otros. Jamieson, 1991) pero esta característica no ha sido observada dentro del Orden Synbranchiformes. El tipo de espermatozoide que posee *S. marmoratus*, pertenece al “tipo I”, de acuerdo con la clasificación de Mattei (1991).

Las células de Sertoli están siempre presentes y asociadas a los cistos en el testículo. Lo más representativo son la forma y ubicación de sus núcleos. Se mantienen unidas entre sí por desmosomas. Estas células fagocitarían cuerpos residuales y células germinales en degeneración incluyendo el espermatozoide residual (Grier, 1993). De hecho, en *S. marmoratus* se han encontrado células en este proceso. Por las características ultraestructurales observadas en este tipo celular se podría inferir su función en la síntesis de esteroides y proteínas.

En *S. marmoratus*, el tejido intersticial en machos primarios y secundarios permanece durante todo el año. Es importante destacar, la abundancia de fibras colágenas en este compartimiento, especialmente en los machos primarios.

La presencia de células de Leydig en el testículo aparece como algo normal en teleósteos (Nagahama, 1983); aún así, Reinboth (1962) notó que en *Coris julis* el testículo de los machos primarios y secundarios carecía por completo de células de Leydig. Roede (1975), en su estudio sobre reversión sexual en los lábridos del Caribe, enfatizó la ausencia de las células de Leydig y, Reinboth y Brusle-Sicard (1997) en su estudio sobre cambio de sexo en *C. julis*, destacó su presencia. Chang y Phillips (1967) y Chan y col., 1975, observaron la degeneración del tejido intersticial en *Monopterus albus* luego de la

espermiación y su reemplazo por una nueva generación de células procedentes del tejido conectivo que mostraban un extenso desarrollo de las células de Leydig durante la reversión sexual. Las células de Leydig en *S. marmoratus*, poseen la ultraestructura típica de las células esteroideogénicas: abundante cantidad de REL y mitocondrias con crestas tubulares.

**CAPITULO II**

**CICLO ANUAL DE LA  
ESPERMATOGÉNESIS.**

## INTRODUCCIÓN

### LOS CICLOS REPRODUCTIVOS

La determinación de los ciclos reproductivos debe tener en cuenta el estudio histológico y fisiológico de la gónada, la frecuencia y momento de la puesta así como la edad reproductiva. Todos estos parámetros constituyen un desafío para la biología reproductiva, la acuicultura y la biología pesquera. Muchas facetas de la estructura y fisiología gonadal aún no son bien entendidas.

El índice gonadosomático (IGS) es comúnmente utilizado como indicador para describir los ciclos reproductivos anuales en peces y es frecuentemente complementado con la histología gonadal y la descripción detallada del tipo de testículo (Grier y Taylor, 1998). En las especies que se reproducen anualmente, el IGS aumenta de un 5 a 10% en salmónidos (Hiroi y Yamamoto, 1968, 1970) y ciprínidos (Solewski, 1957; Weil, 1981); de 0,2 a 2% en varias tilapias (Perciformes) (Peters, 1971) y en *Morone americana* (Perciformes) de 0,8 a 4,6% (Jackson y Sullivan, 1995).

Por otro lado, la producción de esperma ha sido estudiada en un número reducido de especies. Los espermatozoides constituyen la mayor parte de las células en el testículo maduro y por lo tanto, el peso testicular es un buen criterio de la cantidad de esperma producido. Es también evidente que la actividad espermatogénica varía enormemente de unas especies a otras (Nagahama, 1983; Billard, 1986). La razón de estas diferencias no es clara y ello ha sido poco discutido por los autores, aún en revisiones recientes. En *Merluccius capensis* y *M. paradoxus* (Gadiformes) (Osborne y col., 2000), el IGS demostró que estos peces se reproducen en todas las estaciones, ya que las diferencias entre los mismos no fueron significativas. De acuerdo con el IGS, se observó que *Peristedion cataphractum* (Scorpaeniformes) tiene actividad durante todo el año, más del 50% de los especímenes analizados estaban maduros, con un pico en Agosto, y *Holoplothus mediterraneus* (Beryciformes) presenta las mismas características pero con un pico en Mayo (Terrats y Petrakis 2000).

También el análisis morfométrico de los diferentes estadios de las células germinales que ocurren a través del año han sido bien analizados en Salmoniformes

(Billard, 1983, 1987; Scott y Sumpter, 1989). Un registro reproductivo importante, el cual tuvo en cuenta todos los estadios germinales para documentar la condición reproductiva, ha sido desarrollado para *Sillagi ciliata* (Cuvier) (Perciformes) (Goodall y col., 1987) y las clases reproductivas fueron utilizadas para describir el ciclo reproductivo en *Palabrax clathratus* (Girard) (Chironomidae, Perciformes) (Smith y Young, 1966).

Existen en teleósteos numerosas descripciones que indican los estadios de desarrollo de las células germinales durante el ciclo reproductivo anual (Smith y Young, 1966; Ruby y Mac Millan, 1970; Billard y col., 1978; Scott y Sumpter, 1989; Ntiba y Jaccarini, 1990). En otros trabajos se indica que entre una estación de cría y la siguiente se observan espermatogonias en el testículo: *Salvelinus fontinalis* (Henderson, 1962); *Eucalia inconstans* (Gasterostiiformes) (Ruby y McMillan, 1970); *Ictalurus punctatus* (Siluriformes) (Jaspers, 1972); *Hypseleotris galli* (Mackay, 1972); *Gobius melanostomus* (Cypriniformes) (Moyseyeva y Ponomareva, 1973); *Glyptothorax kashjirensis* (Siluriformes) (Koul, 1974); *Zoarcetes viviparus* (Perciformes) (Kristofferson y Pekkrinen, 1975); *Schizothoras plagostomus* (Cypriniformes) (Shresta y Khanna, 1976); *Tinca tinca* (Cypriniformes) (Shikhshabekov, 1976) y *Ide idus idus* (Cypriniformes) (Cala, 1976). Sin embargo el mecanismo de regresión testicular y ciclo celular anual entre estaciones de cría, es conocido sólo para unas pocas especies como *Centropomus undecimalis* y *Esox niger* (Grier, 1993; Grier y Taylor, 1998; Taylor y col., 1998).

Ocasionalmente, se presentan preparaciones histológicas con una descripción general de cuándo ocurre la puesta (Shikhshabekov, 1972, 1978). También se han utilizado criterios histológicos para documentar los periodos críticos de desarrollo gonadal en *Salvelinus alpinus* L., basándose en la producción de oogonias y la de espermatocistos (Rice y Burton, 2000).

El cambio en el volumen testicular ha sido utilizado para documentar el ciclo reproductivo anual en peces. En los Cypriniformes, *Schizothoras plagostomus* (Shresta y Khanna, 1976) y *Garra gotyla* (Shresta y Khanna, 1978), los cambios anuales en el volumen testicular entre los regresados y los reproductivos es de 9 y 35 veces,

respectivamente. Los testículos de los teleósteos también aumentan en longitud durante el recrudecimiento (Macer, 1974; Ntiba y Jaccarini, 1990).

Aunque los cambios en el volumen testicular, histología, índice gonadosomático y registros reproductivos han sido utilizados para documentar los ciclos en los machos, el mecanismo fundamental del crecimiento y la regresión testicular son pobremente entendidos. Estos aspectos han sido registrados sólo para un par de especies de Perciformes (Grier y Abraham, 1983; Grier y col., 1987; Grier, 1993).

Basándose en la morfología comparada entre clases de cordados, la terminología ha sido revisada y aplicada a los testículos de varios teleósteos (Grier, 1992).

Los períodos durante los cuales ocurre la espermatogénesis así como el tiempo al cual las gametas son liberadas difieren ampliamente (Billard y Breton, 1978; Ntiba y Jaccarini, 1990; Taylor y col., 1998). Se asume que la espermatogénesis es continua en el guppy *Poecilia latipinna* (Cyprinodontiformes), dado que en el laboratorio la hembra parece estar grávida a lo largo del año (Billard, 1966). En la naturaleza, la espermatogénesis es estacional en las especies de zonas de temperatura: la espermatogénesis ocurre en el verano en *Salmo salar* (Salmoniformes) (Jones y Orton, 1940); *Savelinus fontinalis* (trucha de arroyo) (Henderson, 1962), y el pike (Esociformes) (Lofts y Marshal, 1957) y en el besugo es en primavera (Papadopol, 1962). En algunos casos puede comenzar en otoño y finalizar en primavera como en el caso de *Gasterosteus* sp. (Gasterosteiiformes) (Craig-Bennet, 1931). También parece ser estacional en algunas especies tropicales y subtropicales (Lam, 1983) como *Barbus liberiensis* (Payne, 1975) y *Tilapia nigra* (Hyder, 1970).

## EL EPITELIO GERMINAL

Los cambios anuales en el “epitelio germinal” testicular han sido utilizados sólo recientemente para clasificar y describir clases de maduración en el testículo del common snook, *Centropomus undecimalis* Bloch (Perciformes) (Grier y Taylor, 1998; Roberts y col., 1999).

El compartimiento germinal puede ser claramente distinguido del intersticial por la membrana basal que los separa. Las técnicas histológicas han hecho posible definir distintos tipos de compartimientos germinales entre los taxa de cordados, formular una

hipótesis sobre la evolución de los testículos y distinguir tipos de testículos en teleósteos (lobular y tubular anastomosado).

Los epitelios constituyen un grupo de tejidos con características comunes (Wheater y Burkitt, 1987). Las células epiteliales están lateralmente unidas unas con otras. Su extremo distal tapiza la superficie del cuerpo, de una cavidad o un tubo y la proximal apoya sobre una membrana basal. Los epitelios se clasifican como: simple (plano, cúbico o cilíndrico), pseudoestratificado, estratificado (plano, cúbico y cilíndrico) y transicional (Warwick y Williams, 1973; Cormack, 1987; Fawcett y Jensch, 1997, Geneser, 2000), dependiendo de su estructura y función. El epitelio germinal está constituido por dos tipos celulares distintos: células somáticas y germinales, por lo tanto debe ser redefinido como constituido por estas células, las cuales están sostenidas por una membrana basal y tapizan una cavidad del cuerpo como el lóbulo testicular (al momento de la espermiación) o el tubular anastomosado. Las definiciones aplicadas a las estructuras biológicas deberían ser unificadas entre los taxa, por ejemplo, entre peces y mamíferos.

Los cambios en el epitelio germinal de los testículos, en *Centropomus undecimalis*, han sido definidos y utilizados para explicar una progresión de clases reproductivas durante el ciclo reproductivo anual y este criterio está siendo actualmente muy aceptado y utilizado aun, para especies de diferentes ordenes y ambientes. Estas clases reproductivas, han sido definidas basándose en la alternancia entre epitelio germinal continuo y discontinuo y la preponderancia de los estadios de las células germinales (Taylor y col., 1998; Grier y Taylor, 1998). Figura 33.

Es importante remarcar que en los cordados, el “epitelio germinal permanente” aparece por primera vez en los teleósteos (Grier y Taylor, 1998) y no en los anfibios, como originalmente fuera descrito por Lofts (1987).

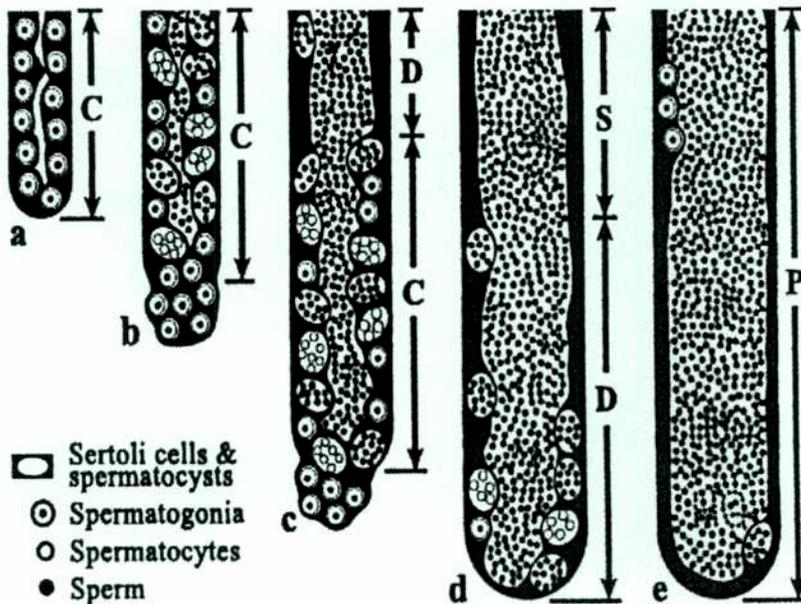
## **REGULACIÓN DE LA DIVISIÓN CELULAR: CICLINAS**

La clave para entender la regulación del ciclo meiótico, fue descubierta hace 29 años en oocitos de *Xenopus* (Amphibia), donde se encontró un componente celular esencial al que llamaron “factor promotor de la maduración” (FMP) (Massui y Market, 1971; Smith y Eckert, 1971). Posteriormente se determinó que este factor participaba

**Figura 33.**

Clases reproductivas en *C. undecimalis*, basadas en la presencia de epitelio germinal continuo (C) y discontinuo (D).

El esperma se desarrolla dentro de espermatocistos cuyos bordes están formados por células de Sertoli. (a) Clase regresada: sólo se observa presencia de espermatogonias (SPG). (b) Clase maduración temprana: un epitelio germinal continuo se extiende desde los conductos hasta la periferia del lóbulo. (c) Clase maduración media: se observa un epitelio germinal discontinuo cerca de los conductos mientras que el continuo se encuentra localizado en la periferia del testículo. (d) Clase maduración final: se observa un epitelio germinal discontinuo hasta el extremo distal del lóbulo. (e) Maduración final antes de la regresión: la espermatogénesis ha finalizado y se observan SPG desparramadas por el lóbulo y un epitelio permanente que está formado por células de Sertoli (P). Se observa que el crecimiento lobular es centrífugo. Tomado de Grier, 2000.



tanto del ciclo meiótico como del mitótico, por lo cual se lo consideró el inductor universal de la fase M o factor promotor de la metafase (FPM).

Está constituido por dos subunidades: a) la pequeña, llamada p34 o CDK, es una proteína quinasa de 34000 D. Fue descubierta en levaduras (Nurse y col. 1990). Está codificada por el gen *cdc 2* (*cdc*: genes que controlan la división celular) en levaduras. Si bien está presente durante todo el ciclo meiótico, sufre modificaciones significativas durante el mismo, a nivel de fosforilaciones activantes e inhibitorias de determinados aminoácidos. b) La otra subunidad del FPM es la ciclina, una proteína de 56000 D (*p56, cdc13*). Los productos transcritos por el gen *cdc13* son homólogos a la ciclina, este gen fue clonado para levaduras y su secuencia es semejante a la ciclina B encontrada en numerosos animales. Se la considera la subunidad reguladora.

Se conocen tres tipos de ciclinas A, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, cuyos mensajeros están presentes en diversos animales (Westendorf y col. 1989; Kobayashi y col., 1991). El papel de la ciclina B<sub>2</sub> es el más conocido hasta la actualidad respecto de su función en la maduración. El inicio de la metafase meiótica, en *Xenopus* es regulado por la activación de la p34 y su asociación con la ciclina (Jesus y Ozon, 1993). La p34 permanece alta durante la metafase fosforilando varias proteínas y declina durante la transición de anafase a telofase por un proceso dependiente de ubiquitinas. Los oocitos de anfibios tienen una cantidad sustancial de FPM almacenado. Este factor fue caracterizado en *Xenopus* por Lohka y col., (1988); Gautier y col. (1990) y Dorée (1990).

En *Carassius auratus* (goldfish)(Katsu y col, 1993; 1999) y en *Brachydanio rerio* (zebrafish) (Kondo y col., 1997), se observó que la maduración de los oocitos también es controlada por el complejo CDK-ciclina. Los oocitos de estos peces tienen almacenado CDK y el ARN mensajero para ciclina B (mensajero disfrazado), pero no ciclina B. Cuando ocurre el estímulo de la hormona estimuladora de la maduración (MIS), se sintetiza la ciclina a partir del mensajero almacenado, se forma el FPM y la meiosis puede proseguir. Es decir que la aparición de la subunidad reguladora del FPM es suficiente para iniciar la maduración.

Kajiura-Kobayashi y colaboradores (1999) encontraron en la *Anguilla japonica* (Anguiliformes) ARN mensajero para ciclinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> y observaron que éstos aumentan después de la iniciación de la espermatogénesis y durante la proliferación

espermatogonial. Con hibridización *in situ* en testículos tratados con GCH (gonadotropina coriónica humana ) como inductor, demostraron que unas pocas espermatogonias expresan ciclinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> antes del tercer día de tratamiento. Posteriormente a éste la mayoría de las espermatogonias presentan ARN mensajero para ciclinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>. El análisis por *western blot* detectó un aumento de ciclinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> durante la proliferación gonial que alcanza un meseta cuando las células espermatogoniales se diferencian en espermatocitos.

Actualmente se sabe que, en las células somáticas hay varios factores que regulan el ciclo celular. El ciclo de las células somáticas está funcionalmente dividido en cuatro estadios. Después de la mitosis (M) hay un período de prereplicación (G1), después del cual tiene lugar la síntesis de ADN (S). Luego del período de síntesis hay un estadio premitótico (G2), el cual es seguido por la mitosis. La regulación del ciclo celular incluye procesos que conducen a una célula de una fase del ciclo a la siguiente. Está regulado por factores de crecimiento y por un sistema de control que está constituido por ciclinas y proteinkinasa (CDK) dependientes de ciclinas. Este sistema permite el pasaje por dos puntos de control, G1 que lleva a la célula a la fase de síntesis y G2 a la mitosis.

Las ciclinas son proteínas que controlan la actividad de las CDK, éstas solo se activan por unión con las ciclinas. La concentración de éstas varía en forma cíclica, es decir que aumentan y disminuyen durante el ciclo celular. En mamíferos existen seis ciclinas, denominadas A a F, pero es más importante su clasificación en ciclinas G1 y ciclinas mitóticas. Las ciclinas G1 se unen a CDK durante G1 y son necesarias para que el ciclo supere el punto de control G1 y pase a la fase S. Las ciclinas mitóticas se fijan a CDK durante G2 y son necesarias para que el ciclo supere el punto de control G2 y pase a la mitosis. Al complejo que forman CDK-G2 también se lo llama factor promotor de la mitosis (FPM). Las ciclinas y CDK son codificadas por los genes *cdc*.

La actividad del complejo CDK-ciclina comprende una serie de fosforilaciones. Por ejemplo la fosforilación de la histona H<sub>1</sub> que induce la condensación de la cromatina, las de las proteínas de la lámina nuclear que inducen la ruptura de la membrana nuclear y las de las proteínas que forman los microtúbulos del huso mitótico, favoreciendo la formación de éste, entre otras.

Hacia el final de la mitosis, en la transición entre la metafase y la anafase, la CDK del complejo CDK-ciclina, activa una enzima que degrada la ciclina, en consecuencia la concentración de ésta baja, por lo cual la CDK se inactiva. Ésto tiene por efecto, que se desfosforilen las proteínas de la lámina nuclear y se vuelva a formar la membrana nuclear, por otro lado se controla que los cromosomas estén bien ubicados en la placa metafásica y relacionados con el huso. Así, la destrucción de la ciclina separa a la célula de la mitosis y de la transición a la fase G1, por lo que también se habla de un punto de control de la metafase. Ésta representa además un sitio de reducción de la velocidad, donde la célula realiza un “control de seguridad”, antes de iniciar un nuevo ciclo.

### **PRESENCIA DE 3 $\beta$ -HSD EN CÉLULAS DE LEYDIG Y SERTOLI**

La abundancia de las células intersticiales varía con las especies de teleósteos. Usualmente están distribuidas aisladamente o en grupos entre los lóbulos de los testículos. Histoquímicamente, la 3-beta-hidroxi-delta5-esteroide-dehidrogenasa (3 $\beta$ -HSD) es una enzima involucrada en la síntesis de hormonas esteroideas, y ésto ha sido demostrado en las células intersticiales de los testículos de ciertos teleósteos, ejemplos: *Blennius* sp. (Chieffi y Botte, 1964); *Gobius paganellus* (Stanley y col., 1965); *Tilapia mosambica* (Yaron, 1966; Hyder, 1970); *Cymatogaster aggregata* (Wiebe, 1969); *Carassius auratus* (Yamazaki y Donaldson, 1969); *Poecilia reticulata* y *Oryzias latipes*, (Takahashi y Iwasaki, 1973a, b); *Oncorhynchus mykiss* (Van der Hurk, 1978a y b, Kobayashi y col., 1996). En *Monopterus albus* (Tang y col., 1975) también se encontró actividad esteroideogénica en las células intersticiales. Lo mismo ha sido observado en *Anguilla anguilla* (Grandi y Barbieri, 1987); *Podogobius martensi* (Cinquetti, 1994) y en *Oncorhynchus mykiss* (Kobayashi y col., 1996); *Esox lucius* y *E. niger* (Grier y col., 1989).

Como se mencionara en el capítulo anterior, observaciones al microscopio electrónico han demostrado que las células intersticiales de los teleósteos, tienen un aspecto ultraestructural típico de células productoras de esteroides. Estas son células poligonales, caracterizadas por un abundante retículo endoplasmático liso y mitocondrias con crestas de tipo tubular. Ejemplos: *Poecilia reticulata* (Follenius y

Porte, 1960); *Gasterosteus aculeatus* (Follenuis, 1968); *Oncorhynchus mykiss* (Oota y Yamamoto, 1966; Van der Hurk, 1978); *Cichlasoma nigrofasciatum* (Nichols y Graham, 1972); *Oryzias latipes* (Gresik, 1973); *Gobius jazo* (Colombo y Burighel, 1974); *Mollenisia latipinna* (Van der Hurk y col., 1974); *Oncorhynchus kisutch* y *O. Gorboscha* (Nagahama y col., 1978); *Anguilla japonica*, (Sugimoto y Takahashi, 1979); *Anguilla anguilla* (Grandi y Barbieri, 1987); *Esox lucius* y *Esox niger* (Grier y col., 1987) y *Padogobius martensi* (Cinquetti, 1994).

Los cambios morfológicos estacionales de las células intersticiales han sido observados en algunos peces teleósteos (Guraya, 1976b; Grier, 1981; Nagahama y col., 1982; Fostier y col., 1983; Callard, 1996). Estas observaciones indican claramente que las células intersticiales son homólogas a las de Leydig de mamíferos y serían el mejor sitio de síntesis de andrógenos (Pudney, 1998). Es interesante destacar que en *Oncorhynchus mykiss* y cuando los estudios han sido hechos a través de todo el ciclo sexual, la actividad esteroideogénica de las células intersticiales aparece en el momento en que los espermatozoides están presentes en el testículo (Van der Hurk y col., 1978).

Algunos estudios histoquímicos revelaron también la presencia de actividad 3 $\beta$ -HSD en las células de Sertoli de *Cymatogaster aggregata* (Wiebe, 1969), en *Tilapia mosambica*; en *Fundulus heteroclitus* (Bara, 1969), en varias especies vivíparas y ovíparas comparativamente (Van der Hurk, 1973); en *Oncorhynchus mykiss* (Van der Hurk y col., 1978). Sin embargo, muchas de las observaciones al M.E. no refuerzan estos resultados histoquímicos (Kobayashi y col., 1996). Las células de Sertoli de muchos de los grupos estudiados hasta la fecha, tienen un aspecto ultraestructural que sugiere fagocitosis y participación en el transporte de metabolitos. No obstante, en las células de Sertoli de ciertas especies de teleósteos se encontró que tienen algún rasgo ultraestructural, comúnmente aceptado como característico de células productoras de esteroides, como por ejemplo las crestas tubulares de las mitocondrias, las cuales son variables, el tamaño del retículo endoplasmático agranular (aunque mucho menos desarrollado que en las células de Leydig) y la presencia de gotas de lípidos (Nicholls y Graham, 1972; Van der Hurk y col., 1974, 1978; Hourigan y col., 1991). Presentan además, un aparato de Golgi prominente y conjuntos de gránulos de glucógeno, sugiriendo que las células de Sertoli son menos activas en la esteroidogénesis (Pudney,

1998). Las células de Sertoli también poseen aspecto ultraestructural comparable al de los mamíferos (Billard y col., 1972; Gresik, 1977) Por otro lado Kobayashi y col., (1996) encontraron en *Oncorhynchus mykiss* que las células de Sertoli no son inmunoreactivas a 3 $\beta$ -HSD.

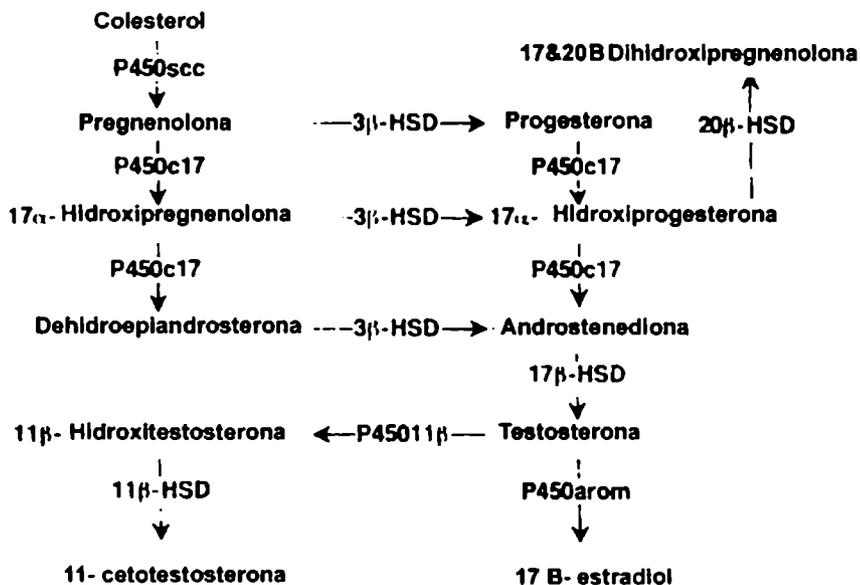
De acuerdo con Godwin y Thomas (1993), en *Amphiprion melanopus* (Pomacentridae), las células de Leydig: son las que tienen características más sobresalientes respecto de la producción de esteroides, mientras que en las de Sertoli la esteroidogénesis es limitada.

Durante el curso de la diferenciación sexual, el comportamiento de las células somáticas dentro de la gónada es a menudo sexo-específico. Si las hormonas esteroideas son críticas en la iniciación de la diferenciación sexual, la aparición de las células productoras de esteroides y las diferencias en la producción de los mismos entre sexos, debería ser aparentemente anterior a la diferenciación morfológica de la gónada. De hecho, Nagahama (2000) examinó las células productoras de esteroides durante el desarrollo gonadal en tilapia, pudiendo clonar y secuenciar enzimas esenciales para la esteroidogénesis: P450, P450SSC, 3 $\beta$ -HSD, 17 $\beta$  hidroxilasa, etc.

Se sabe que los esteroides sexuales poseen un potente efecto en el proceso de la diferenciación sexual en peces gonocóricos como el medaka (*Oryzias latipes*) y en goldfish (*Carassius auratus*). Las hormonas sexuales actúan específicamente como inductores del sexo: los estrógenos como feminizantes y los andrógenos como masculinizantes.

Estudios realizados en la llamada anguila arrocera, *Monopterus albus*, (protogínica) fueron de particular interés dada su capacidad de reversión sexual natural. La misma estuvo invariablemente asociada a la proliferación de células de Leydig en el intersticio de la lamela gonadal. Estas características citológicas junto con el aumento en la producción de andrógenos durante la fase de intersexo, indican que los cambios en el perfil de secreción de esteroides son concomitantes con la expresión de la fase macho. En este caso, técnicas histoquímicas han demostrado la presencia de las enzimas 3 $\beta$ -HSD y 17 $\beta$ -HSD así como un aumento en la producción de andrógenos durante la reversión sexual (Yeung y col., 1985). Obviamente, la falta de anticuerpos específicos contra esta enzima, hace que el análisis de la misma sea dificultoso.

Como ejemplo, la siguiente figura, presenta la biosíntesis de esteroides en la tilapia, *Oreochromis niloticus* y las enzimas involucradas (Tomado de Nagahama, 2000).



## MATERIALES Y MÉTODOS

### IIA) CICLO ANUAL:

1) La metodología utilizada en cuanto a la captura, transporte y mantenimiento de los ejemplares así como las técnicas utilizadas para microscopía óptica son las mismas que en el capítulo 1.

### 2) DETECCIÓN DE LA DIVISIÓN CELULAR

**Técnica inmunohistoquímica: PCNA (“proliferating cell nuclear antigen”).**

El antígeno de proliferación celular (PCNA) es una proteína nuclear no histónica de 56 kDa altamente conservada, también conocida como ciclina. Fue inicialmente identificada como un autoantígeno en pacientes con *lupus eritematoso* pero luego fue demostrado su papel como proteína auxiliar del ADN en la replicación. Está sintetizada durante la fase G1 temprana y S del ciclo celular y es muy útil como marcador molecular de células en proliferación (Okada y col., 1996).

Esta técnica inmunohistoquímica fue utilizada para detectar actividad de proliferación celular durante algunas etapas del ciclo reproductivo anual, manifestándose en aquellas células que poseen alta expresión de ciclinas.

Pequeños trozos de testículo de diferentes períodos del año fueron fijados en soluciones de Bouin, Formol 4% y Alcohol 70°, combinando diferentes montajes como albúmina, gelatina 2% y Vectabond (Vector Laboratories, Burlingame, CA) a fin de determinar experimentalmente el mejor fijador y medio de adhesión al portaobjeto. Cortes de 4,5 µm incluidos en parafina, fueron montados y secados al aire, a temperatura ambiente, durante una noche. Luego fueron desparafinados utilizando xileno, hidratados en gradación decreciente de etanol (100% a 50%) y posteriormente dos lavados con PBS (buffer fosfato salino, 5 mM, pH 7,6) de 5 min. cada uno. Luego de bloquear las peroxidasas endógenas usando una solución de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3% durante 10 min., los cortes fueron lavados nuevamente con PBS en 2 series de 5 min. cada una.

Debido al enmascaramiento que generan los fijadores sobre los antígenos, previo a realizar la inmunomarcación, se procedió a recuperar los mismos utilizando una de las técnicas, conocida como *antigen retrieval* (Shi y col., 1993 y de Portiansky y Gimeno, 1996), y modificada de acuerdo con Ortego y col. (1994) y Chapman y col., (1994).

Los cortes ya montados fueron sumergidos en una solución de sulfato de Zinc 1% y se los calentó en un microondas de 700 W de potencia a 100°C durante 2 min. Se los dejó enfriar por 1min. y se repitió el procedimiento dos veces. Posteriormente se lavó con agua destilada por 5 min. De este modo, el “mallado” formado por el fijador sobre los antígenos, se rompía permitiendo su libre exposición.

Los sitios inespecíficos de unión, fueron bloqueados utilizando leche en polvo descremada, 5% en PBS, por 40 min. y posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario (monoclonal PC10 levantado en *mouse*, anti-PCNA; Enzo Diagnostics Inc, N.Y., USA) en una dilución 1:30, durante 1.30 hs. a temperatura ambiente. Luego de lavar durante 5 min., se agregó el segundo anticuerpo biotinilado: anti-Mouse IgG levantado en caballo (Sigma Chemical Co., St. Louis,) en una dilución de 1:15, durante 1 h. a temperatura ambiente. Seguidamente, se lavó en PBS y se agregó el complejo Estreptoavidina- Biotina (ABC- Vector Laboratories, Burlingame, CA) por 1 h. a temperatura ambiente.

Para el revelado de las marcas se utilizó una solución de 3,3' diaminobencidina en buffer Tris 0,1 M, pH 7,2 (DAB-Vector Laboratories, Burlingame, CA) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30%) al 0.02%. Los cortes fueron revelados bajo observación constante en microscopio y la reacción fue detenida lavando los cortes en agua corriente. Luego fueron deshidratados en gradiente de alcoholes y se les colocó un cubre para su observación. Algunas muestras fueron contracoloreadas con verde luz o hematoxilina de Carazzi, previo a la deshidratación y montaje definitivo en DPX o Permout. Los cortes control fueron tratados con PBS en lugar del anticuerpo primario.

Las observaciones y fotografías fueron realizadas utilizando un Nikon-Microphot FX y película para diapositiva Fuji 100 asa y para papel color, Kodak Ultra de 400 asa).

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se utilizó el programa "Instat Graphic Pad" con ANOVA de 1 factor y el test de Tukey-Kramer para comparaciones múltiples. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando  $p < 0.05$ .

## IIB) LOCALIZACIÓN DE LA ENZIMA 3 $\beta$ -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA (3 $\beta$ HSD) EN CORTES DE TESTÍCULO.

### Técnica histo-enzimática:

La técnica consiste en hacer reaccionar a la enzima presente en el tejido con su sustrato y evidenciar la reacción a través de una coloración determinada. Para identificar la enzima, se utiliza su capacidad de oxidar un esteroide con un grupo -OH en el carbono 3 y en posición  $\beta$ , en presencia del cofactor  $\beta$ -NAD ( $\beta$ -nicotinamida adenín dinucleótido), el cual se reduce. Se agrega una sal de tetrazolio, aceptora de hidrogeno, que al reducirse deja una deposición violácea como fino granulado, en el interior de las células que poseen actividad para esta enzima (Troyer, H., 1980; Bancroft y Stevens, 1990; Vizziano, 1995).

Pequeños trozos de testículos frescos provenientes de animales de diferentes épocas del año, sin fijar, fueron criopreservados en sacarosa 10% por 1 h., pasados luego a sacarosa 15% por 3hs. y a sacarosa 20% durante 20 hs, todo a 4°C. Las piezas fueron incluidas en Tissue-Tek (Miles Inc., USA) dentro de tacos de papel aluminio y guardadas en freezer a -20°C por al menos 2 hs. Luego fueron desmontadas y seccionadas con micrótopo de congelación -12°C. Cortes de 4 $\mu$ , fueron montados en portas previamente lavados con una mezcla de HCl 10%- etanol 96° (50:50) para desengrasarlos.

Se realizaron incubaciones con 3 medios diferentes durante 1,30 h. a 37°C: “mezcla de reacción completa”, “mezcla sin esteroide” (control de actividad endógena) y “mezcla sin cofactor” (blanco). El diseño experimental se realizó de la siguiente manera:

#### \*\* Mezcla de reacción completa:

- Sustrato: 100  $\mu$ l de solución de esteroide dehidroepiandrosterona (DHEA) (5-androsten-3 $\beta$ ol-17-ona). 2 mg en 1ml de dimetilsulfóxido (DMSO).
- 100  $\mu$ l de solución de cofactor NAD: 7,5 mg en 500  $\mu$ l de buffer fosfato 0,1 M, pH 7,6 (B.F.).
- 400  $\mu$ l de solución de *Nitro Blue Tetrazolium* (N.B.T.) [2,2'-Di-p-nitrophenyl-3,3'-(3,3'-di-methoxy-4,4'-diphenylene) ditetrazolium chloride]. 5 mg en 2 ml de agua desionizada.
- 400  $\mu$ l de B.F.

Volumen final de reacción: 1ml.

**\*\* Medio sin esteroide**

100  $\mu$ l DMSO + 100  $\mu$ l NAD + 400  $\mu$ l NBT + 400  $\mu$ l B.F.

Volumen final de reacción: 1ml.

**\*\* Medio sin NAD**

100  $\mu$ l DHA, 100  $\mu$ l BF + 400  $\mu$ l NBT + 400  $\mu$ l B.F.

Volumen final de reacción: 1ml.

Se utilizó un corte de músculo del animal como control negativo de la reacción. Finalizada la incubación, los cortes fueron lavados en B.F. y se realizó una fijación suave del tejido en formol de Baker (10 ml. de formol neutro, 10 ml de solución acuosa de cloruro cálcico anhidro 10% y 80 ml de agua destilada) a 4°C por 10 min. y nuevamente un lavado rápido en B.F.

Los preparados fueron montados en glicerol/B.F. y algunos contracolorados posteriormente con verde luz. Fueron examinados y fotografiados, según detección de una deposición azulada, con un microscopio Microphot FX Nikon, utilizando película Tmax 100 o Kodak color 400 asa.

## RESULTADOS

### CICLO ANUAL

Basado en los cambios que tienen lugar en el epitelio germinal y los tipos de células germinales presentes en el testículo, el ciclo reproductivo anual fue dividido en 5 clases reproductivas: “regresada”, “maduración temprana”, “maduración media”, “maduración final” y “en regresión”. El compartimiento germinal, el cual está delineado por una membrana basal, esta organizado en lóbulos los cuales están constituidos por células de Sertoli y células germinales en distintas etapas de la espermatogénesis. Durante las primeras clases reproductivas, los lóbulos crecen por divisiones mitóticas y meióticas de las células que las componen, formando ramificaciones que se extienden desde la región proximal hacia la periferia del testículo (Figura 34a). En las clases donde el proceso de maduración está avanzado, los lóbulos forman anastomosis en la región proximal (Figura 36b). El esperma se desarrolla dentro de los denominados espermatocistos cuyos bordes están formados por procesos de células de Sertoli. El compartimiento intersticial contiene prominentes células de Leydig, células mioideas, vasos sanguíneos y fibras colágenas las cuales son detectadas tanto en la época no reproductiva (Figura 34c) como en la reproductiva (Figura 37f). Se observan centros melanomacrofágicos durante todo el año pero éstos son particularmente abundantes pasada la época reproductiva (Figura 38c), así como durante el proceso de reversión sexual.

A nivel de las distintas etapas del ciclo, no se observaron diferencias significativas comparando el testículo de un macho primario con el de un secundario por lo cual se presentan indistintamente figuras de uno u otro.

**CLASE REGRESADA:** en estos testículos, se puede observar que los lóbulos crecen y se ramifican desde los conductos eferentes hacia la periferia del testículo, terminando allí en forma ciega (Figura 34a). La elongación de la gónada se produce por divisiones mitóticas de las células germinales y de Sertoli. Esta clase posee un epitelio germinal continuo consistente en células de Sertoli conspicuas, espermatogonias tipo A (SPG A) rodeadas por los procesos de las células de Sertoli y espermatogonias tipo B (SPG B) agrupadas en número variable dentro de los espermatocistos (Fig 34b). Esta clase representa el comienzo de la fase proliferativa de la espermatogénesis. Se observa el

### **Figura 34.**

#### **Clase regresada: A, B, C y D.**

**A)** Corte transversal de un testículo de *S. marmoratus*. Los lóbulos testiculares se ramifican desde la región proximal hacia la periferia (flecha). Hematoxilina-Eosina  
Barra: 150  $\mu\text{m}$

**B)** Detalle de lóbulos con epitelio germinal continuo en la periferia del testículo. Preponderancia de SPG A y B dentro de espermatocistos con 2 o más células. Hematoxilina-Eosina. Barra: 30  $\mu\text{m}$ .

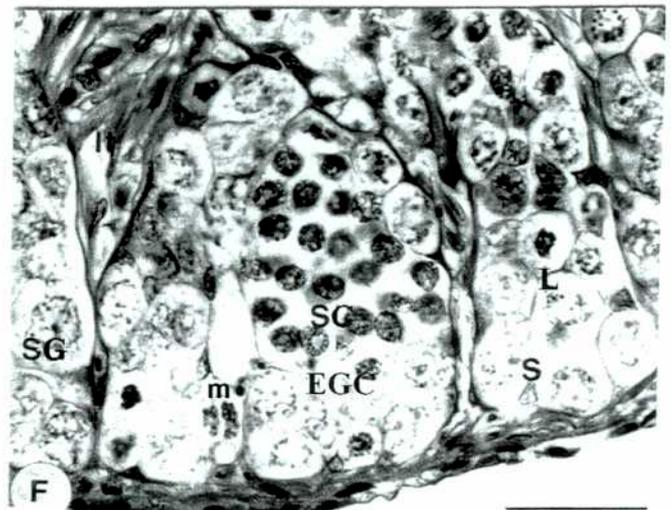
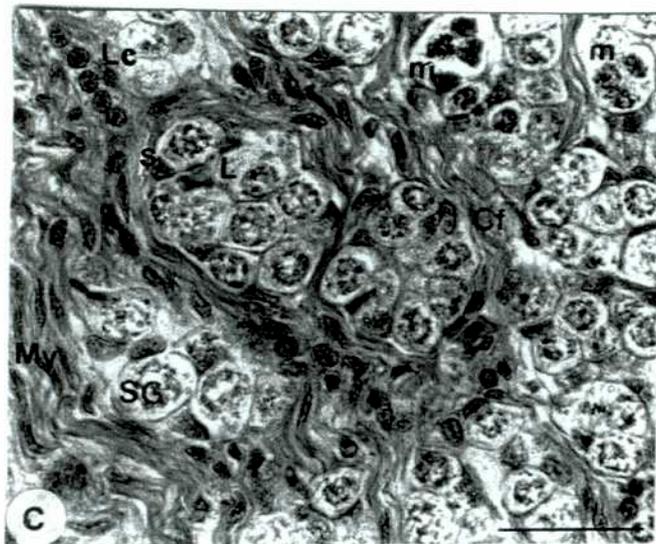
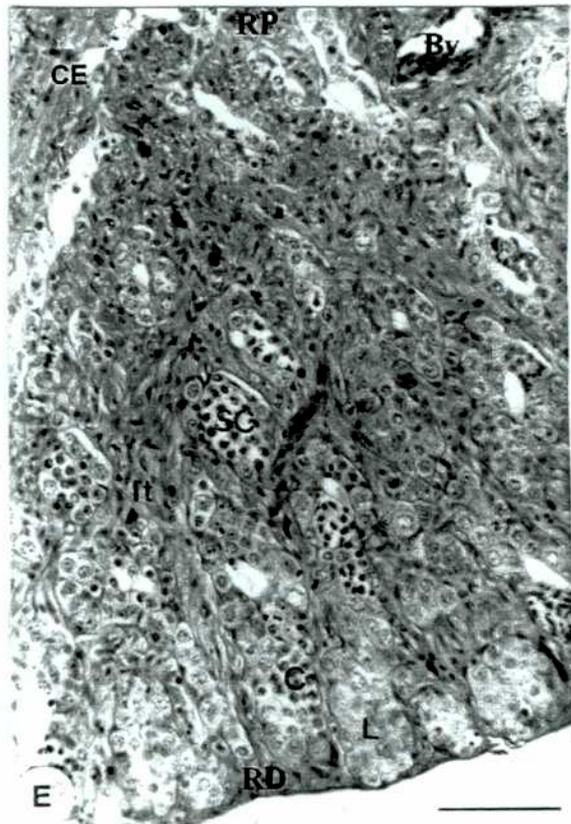
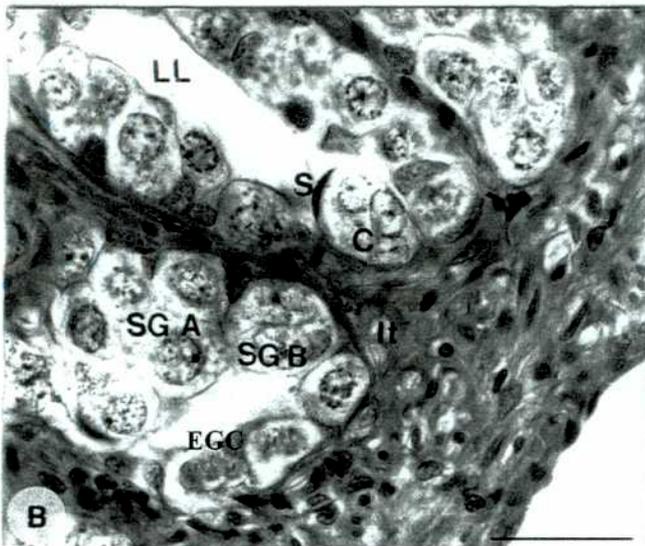
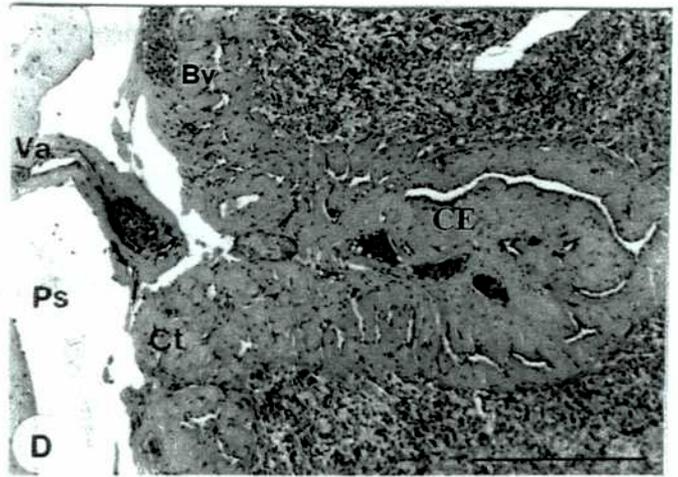
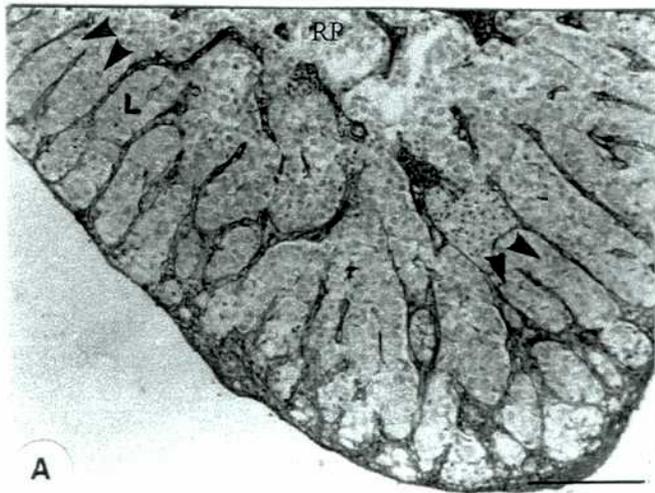
**C)** Compartimiento intersticial. Se observan células de Leydig, abundancia de fibras colágenas y la presencia de células mioides. Hematoxilina-Eosina. Barra: 30  $\mu\text{m}$ .

**D)** Detalle de los conductos eferentes centrales con luz muy reducida (macho secundario). Hematoxilina-Eosina. Barra: 300  $\mu\text{m}$

#### **Maduración temprana: E y F.**

**E)** Corte transversal de un testículo de *S. marmoratus*. Los lóbulos, ya sin luz, se elongan debido a las divisiones mitóticas de las células de Sertoli y las SPG y las divisiones meióticas de los SPC. Se observan las ramificaciones. Preponderancia de SPC I en diferentes estadios de la primera división meiótica y escasos SPC II. La luz de los conductos es algo más amplia que en la clase anterior. Metanil yellow. **F)** detalle de lóbulos con distintos estadios de la espermatogénesis. **E)** Barra: 75  $\mu\text{m}$ . **F)** Barra: 30  $\mu\text{m}$ .

Flecha: proceso de ramificación; Bv: vaso sanguíneo; C: espermatocisto; Ct: tejido conectivo; CE: conductos eferentes; EGC: epitelio germinal continuo; FC: fibras colágenas; It: tejido intersticial; L: lóbulo; Le: células de Leydig; LL: luz del lóbulo; m: mitosis; My: células mioides; Ps: cavidad pseudovárica; RD: región distal; RP: región proximal; S: célula de Sertoli; SC: espermatocitos; SG A: espermatogonia A; SG B: espermatogonia B.



tejido intersticial bien desarrollado (Figura 34c) y los conductos eferentes poseen luz reducida (Figura 34d).

El esperma residual de la estación reproductiva previa, es observado frecuentemente en la luz de los lóbulos y en los conductos eferentes. La luz de los lóbulos está ausente o es discontinua (Figura 34a y b).

La mejor marcación de células en proliferación, durante esta etapa, fue obtenida fijando en formol 4%, montado en portas con Vectabond, incluido en parafina y cortado a 4,5  $\mu\text{m}$ . La técnica inmunohistoquímica utilizada aquí presenta una reacción positiva contra PCNA en ambos tipos: células germinales y de Sertoli. La mayoría de estas células, a lo largo de la pared de los lóbulos poseen reacción positiva. Así, se observa que el epitelio germinal de las gónadas de la clase regresada, poseen un alto nivel de actividad mitótica (Figura 35a).

Los animales muestreados pertenecientes a esta clase reproductiva, se encuentran principalmente entre los meses de abril y agosto (mediados de otoño a mediados del invierno).

**MADURACIÓN TEMPRANA:** durante el proceso de maduración, los lóbulos testiculares continúan su elongación debido a las divisiones mitóticas de las células de Sertoli y de las SPG. Además, parte de las SPG B entran en el proceso de meiosis transformándose en espermatoцитos I (SPC I) y por lo tanto la elongación de los lóbulos por ramificación, desde la región proximal hacia la distal, continúa (Figura 34e). Esta clase reproductiva esta definida por la presencia de un epitelio germinal continuo que se extiende desde los conductos eferentes hasta la periferia del testículo. Representa el comienzo de la fase meiótica, la cual se extenderá hasta el inicio de la espermiogénesis.

El epitelio germinal está representado principalmente por una yuxtaposición de espermatoцитos que se extienden a lo largo de toda la longitud lobular. Se observa una preponderancia de espermatoцитos primarios (SPC I) en diferentes estadios de la primera división meiótica y unos pocos espermatoцитos secundarios (SPC II) (Figura 34e y f).

En esta clase, la ausencia de luz lobular es lo más frecuente, si bien escasos lóbulos aún poseen una luz discontinua. Los conductos eferentes presentan una luz algo más amplia que en la clase regresada.

En esta clase se hace más notorio un aumento, en alto como en ancho, del testículo (Figura 39).

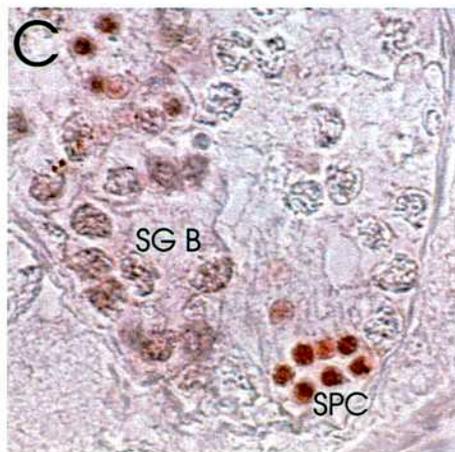
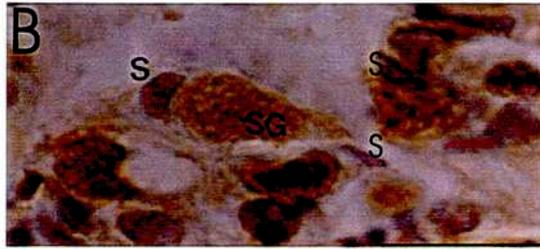
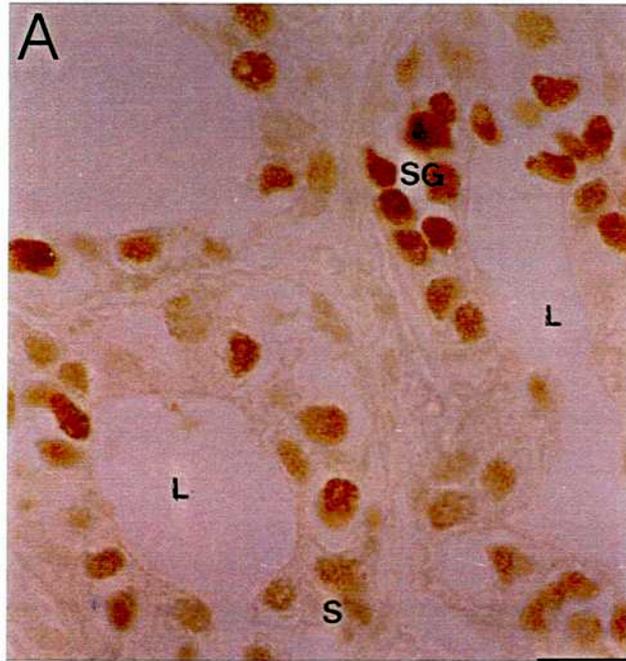
**Figura 35.**

Técnica inmunohistoquímica (PCNA). Marcas positivas en SPG y Sertoli

A) Clase regresada. Barra: 150  $\mu\text{m}$ . B) y C) Maduración temprana. B: Barra: 150  $\mu\text{m}$ .

C: 600x

L: lóbulo; S: célula de Sertoli; SG: espermatogonia; SPC: espermatocito.



Al igual que en la clase regresada, la técnica de PCNA demuestra una reacción positiva en ambos tipos celulares, germinales (SPG y SPC) y de Sertoli (Figura 35b) observándose una activa división celular a lo largo de todos los lóbulos.

Esta clase reproductiva se encuentra principalmente entre los meses de junio y octubre (invierno a mediados de la primavera).

**MADURACIÓN MEDIA:** la figura 36a muestra en corte transversal, una zona (desde la periferia hasta los conductos) del testículo en esta etapa. Esta clase se caracteriza por la presencia de un epitelio germinal discontinuo en la región proximal, cerca de los conductos eferentes y un epitelio germinal continuo en la periferia del testículo.

Durante esta clase se pueden encontrar todos los tipos de células germinales, desde SPG a espermatozoide (SPZ). En ella comienza la etapa de espermiogénesis, pudiendo encontrarse todas las etapas de la diferenciación del espermatozoide. La producción de esperma comienza gradualmente desde la parte proximal de los lóbulos hacia la periferia del testículo y el proceso de ramificación de los mismos continúa (Figura 36a).

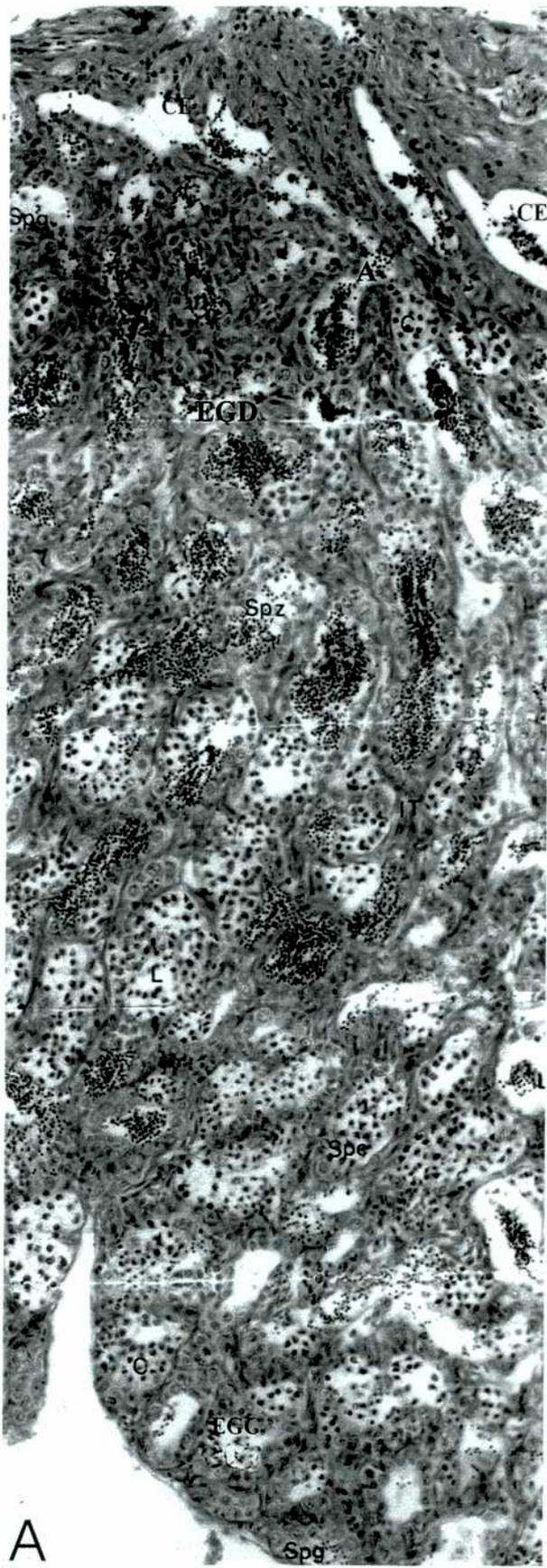
La región proximal, la cual poseía un epitelio germinal continuo, a medida que la maduración prosigue, se transforma en discontinuo. Un epitelio de células de Sertoli, cuyos procesos citoplasmáticos formaban el borde de los espermatocistos, alternan ahora con SPG A y espermatocistos dispersos, resultando en un epitelio de células de Sertoli (Figura 37b). Un epitelio germinal compuesto sólo por regiones de células de Sertoli, alternando con regiones de células de Sertoli asociadas con células germinales es lo que se define como un epitelio germinal discontinuo (Figura 37a). Esta “discontinuidad” en el epitelio germinal, indica el comienzo de la clase maduración media. Las células germinales presentes en la región proximal, son las que finalizan la espermatogénesis primero. El proceso de espermiación (liberación del esperma maduro a la luz de los lóbulos) comienza en esta zona cercana a los conductos y por lo tanto cambia la función de los lóbulos. Estos que en un principio contenían espermatocistos en distintos estadios de la espermatogénesis, pasan a ser, dado el sentido de la maduración, almacenadores de esperma (Figura 36a). Simultáneamente con este proceso, los lóbulos vecinos más proximales comienzan a fusionarse formando anastomosis, elaborando un camino para la salida del esperma. Así, la luz de estos lóbulos se continúa con la de los conductos eferentes (Figura 36b). Los lóbulos de la

**Figura 36.**

**A) Maduración media.** Corte transversal mostrando conductos eferentes con luz más desarrollada. El epitelio germinal proximal es discontinuo y el distal continuo. Se observan todos los estadios de la espermatogénesis. También pueden verse las anastomosis entre las paredes de lóbulos vecinos que al fusionarse, permiten la salida del esperma hacia los conductos. Metanil Yelow. Barra: 150  $\mu\text{m}$ .

**B) Maduración final.** Corte transversal. Lo más destacado de esta clase es la preponderancia de espermatozoides las anastomosis y la discontinuidad del epitelio germinal desde la periferia. Metanil Yelow. Barra: 300  $\mu\text{m}$ .

A: anastomosis; C: espermatocisto; CE: conducto eferente; EGC: epitelio germinal continuo; EGD: epitelio germinal discontinuo; It: tejido intersticial; L: lóbulo; SC: espermatocito; SPG: espermatogonia; SPZ: esperma.



zona periférica carecen de luz y su estado de maduración esta retrasado respecto de los proximales (Figura 37b). El testículo continua creciendo durante esta clase (Figura 39).

Esta clase reproductiva se encuentra principalmente entre los meses de noviembre y febrero (mediados de primavera - verano).

**MADURACION FINAL:** durante esta clase los testículos se transforman principalmente en órganos almacenadores de esperma (Figura 36b). Durante la maduración, la morfología de los lóbulos no se modifica al unísono dado que es un proceso de tipo centrífugo que se inicia en la región proximal y se propaga hacia la periferia del testículo. Por lo tanto, si en un corte histológico, un único lóbulo de la periferia presenta un epitelio germinal discontinuo, éste es el criterio necesario y suficiente que distingue a la clase de maduración final de la maduración media. De este modo, el epitelio germinal discontinuo se extiende a todo el testículo (Figura 37c y d).

Durante la maduración final, los lóbulos se llenan de esperma y la producción del mismo está restringida a la porción periférica del testículo (Figura 37d). Mas aún, las paredes laterales de los lóbulos vecinos continúan fusionándose entre sí, originando una red de lóbulos anastomosados de considerable complejidad que se extiende hasta la periferia del testículo, formando de este modo el camino de salida del esperma hacia los conductos eferentes (Figura 36b). Los lóbulos se transforman en estructuras almacenadoras de esperma.

A lo largo de las paredes de los lóbulos pueden observarse SPG esparcidas entre espermatocistos aislados (Figura 37c y d). Solo una pequeña parte de los lóbulos testiculares está involucrada en el proceso de la espermatogénesis. Los conductos eferentes están llenos de esperma (Figura 37e). Durante esta clase reproductiva, los testículos alcanzan su mayor tamaño (Figura 39).

Esta clase reproductiva se encuentra principalmente desde finales de diciembre hasta principios de marzo (verano).

**CLASE EN REGRESION:** en ésta se observa exclusivamente un epitelio germinal discontinuo compuesto por células de Sertoli entre SPG dispersas (Figura 38a y b) que persisten entre las estaciones reproductivas.

Se encuentran unos pocos espermatocistos con SPC I en proceso de degeneración. Sin embargo, la integridad de los lóbulos dentro del testículo se mantiene intacta (Figura 38a).

**Figura 37.**

**Maduración media: A y B.**

**A)** Región proximal. Se observa la presencia de epitelio germinal discontinuo. Hematoxilina-Eosina. Barra: 30  $\mu\text{m}$ .

**B)** Región distal. Se observa la presencia de epitelio germinal continuo. Metanil yellow. Barra: 30  $\mu\text{m}$ .

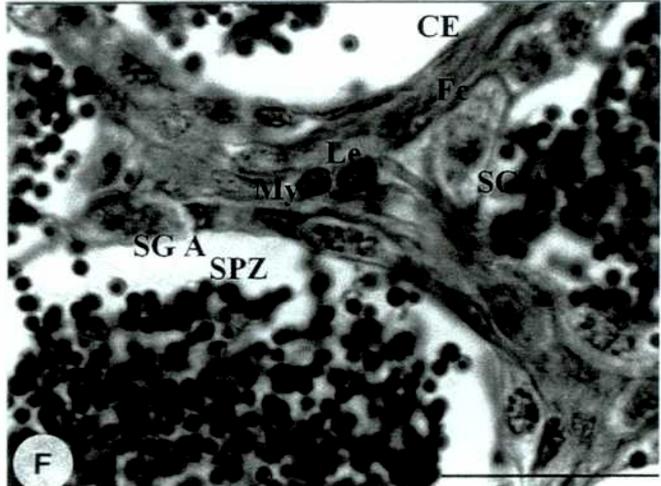
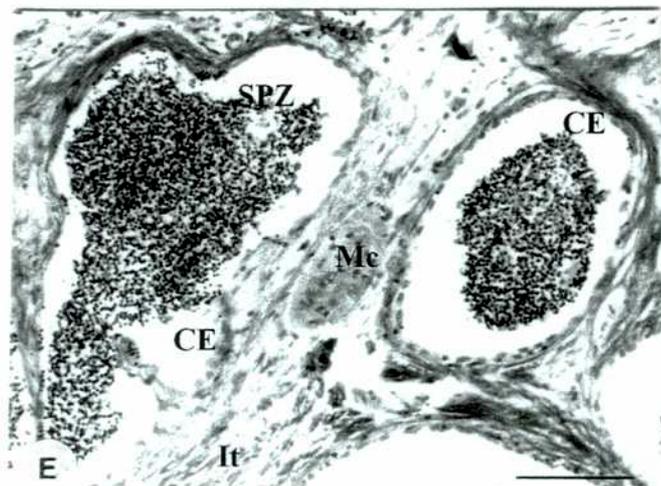
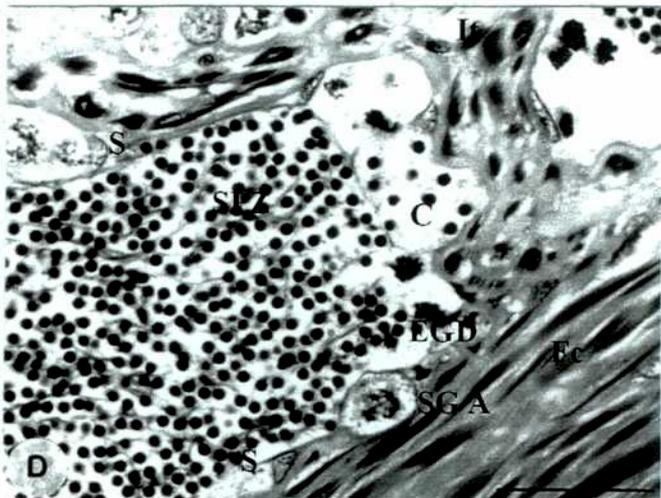
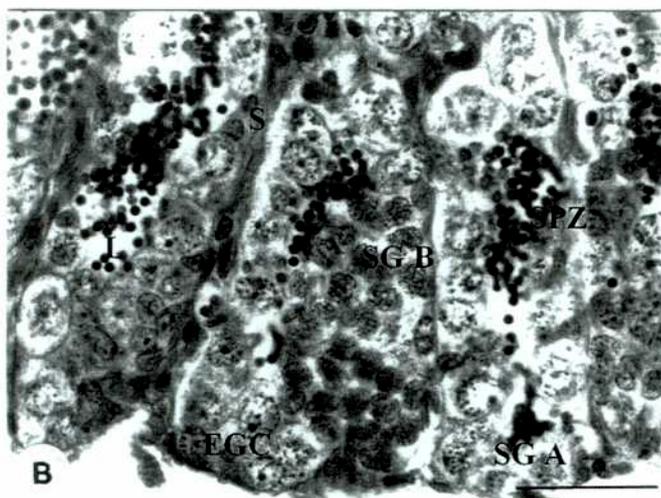
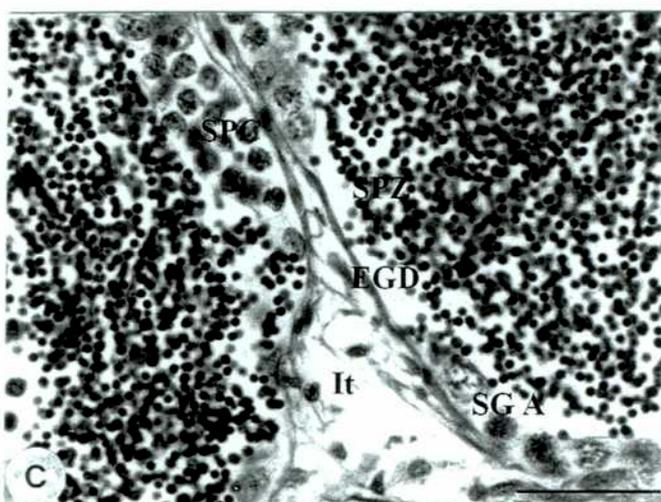
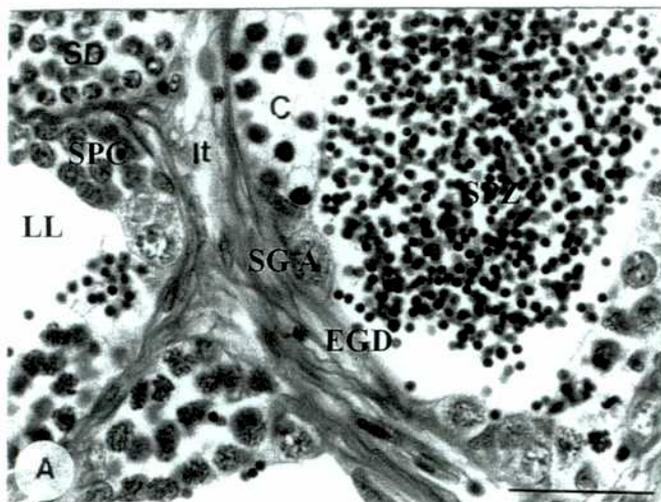
**Maduración final: C, D y E.**

**C) y D)** Región proximal y distal respectivamente. Ambas poseen un epitelio germinal discontinuo. Hematoxilina-Eosina. Barra: 30  $\mu\text{m}$ .

**E)** Detalle de los conductos eferentes cargados de SPZ. Hematoxilina-Eosina. Barra: 75  $\mu\text{m}$

**F)** Elementos presentes en el tejido intersticial en la confluencia entre cuatro lóbulos. Hematoxilina-Eosina. Barra: 30  $\mu\text{m}$ .

C: espermatocisto; CE: conductos eferentes; EGC: epitelio germinal continuo; EGD: epitelio germinal discontinuo; FC: fibras colágenas; It: tejido intersticial; L: lóbulo; Le: célula de Leydig; LL: luz de lóbulo; Mc: centros melanomacrofágicos; My: célula mioide; S: célula de Sertoli; SD: espermátidas; SG A: espermatogonia A; SG B: espermatogonia B; SPC: espermatocitos; SPZ: esperma.



**Figura 38.**

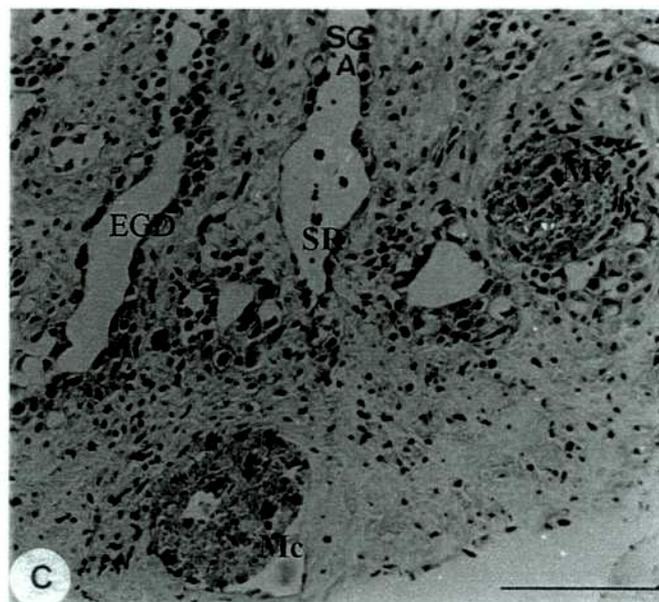
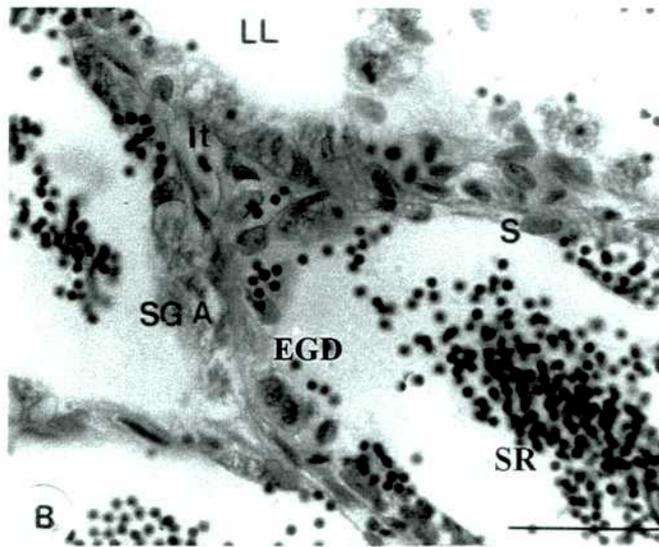
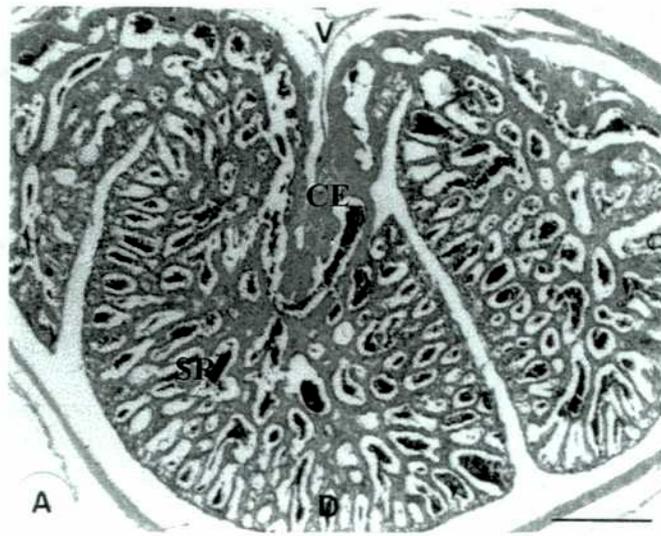
**Clase en regresión: A, B y C.**

**A)** Aspecto general de la gónada. Se observan espermatozoides residuales en lóbulos y conductos. El testículo conserva su estructura lobular. Hematoxilina-Eosina. Barra: 300  $\mu\text{m}$ .

**B)** Detalle de los lóbulos mostrando células de Sertoli y SPG y esperma residual. Los lóbulos mantiene su estructura y su luz es amplia. Se observa la discontinuidad del epitelio. Hematoxilina-Eosina. Barra: 30  $\mu\text{m}$ .

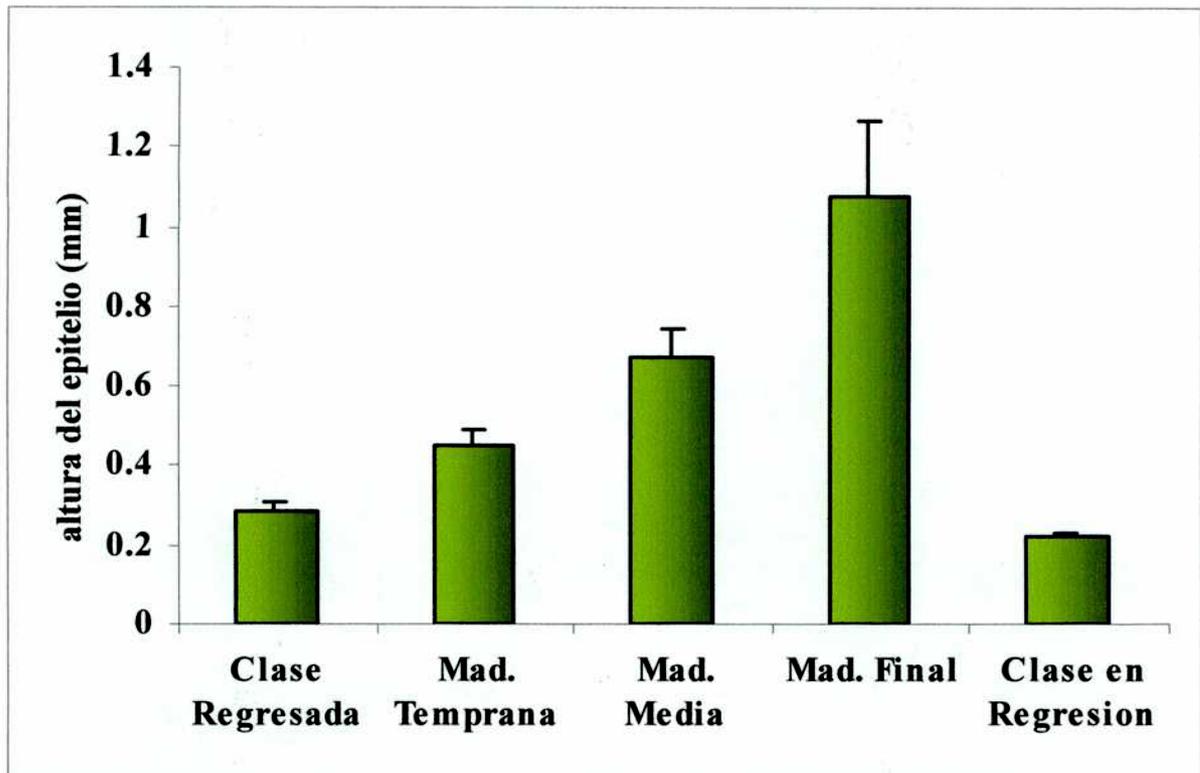
**C)** Los centros melanomacrofágicos son particularmente abundantes pasada la época de puesta. Hematoxilina-Eosina. Barra: 75  $\mu\text{m}$ .

CE: conductos eferentes; D: dorsal; It: tejido intersticial; LL: luz del lóbulo; Mc: centros melanomacrofágicos; S: célula de Sertoli; SG A: espermatogonia A; SR: esperma residual, V: ventral.



**Figura 39.**

Altura del epitelio germinal de los machos secundarios durante el ciclo anual. Las barras representan la media  $\pm$  S.E.M. Los grupos con diferentes letras son significativamente diferentes utilizando el test de Tukey Test ( $p < 0.05$ ).



Cuando el esperma deja los espermatocistos durante la espermiación (maduración final), una espaciosa luz aparece en el lóbulo así como en los conductos eferentes. El esperma residual es comúnmente observable dentro de algunos lóbulos así como en los conductos eferentes durante esta clase (Figura 38a).

Generalmente, se observa tejido intersticial con prominentes vasos sanguíneos y abundantes centros melanomacrofágicos. El testículo reduce su tamaño en esta época (Figura 38c y 6).

Esta clase reproductiva se encuentra principalmente desde finales de febrero hasta abril (fines de verano – mediados de otoño).

La Figura 39 muestra la altura del epitelio germinal obtenida de machos secundarios durante un ciclo anual completo. Se observó la misma tendencia para los machos primarios pero no ha sido graficada dado que el tamaño de la muestra no fue estadísticamente significativo debido a la baja presencia de machos primarios dentro de la población (sólo un 20% dentro de la población total de machos).

## **IIB) LOCALIZACIÓN DE LA ENZIMA 3 $\beta$ -HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA (3 $\beta$ HSD) EN CORTES DE TESTÍCULO.**

El compartimiento intersticial, está constituido por células de Leydig, mioides, fibras colágenas y vasos sanguíneos. Las células de Leydig presentaron marca positiva en su citoplasma con la técnica de 3 $\beta$ -HSD utilizando DHEA como sustrato.

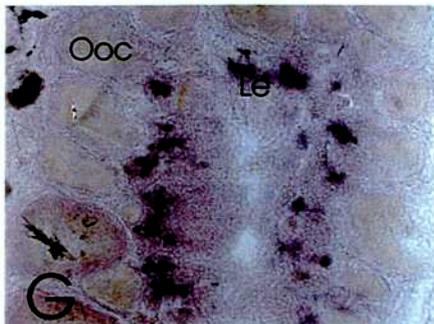
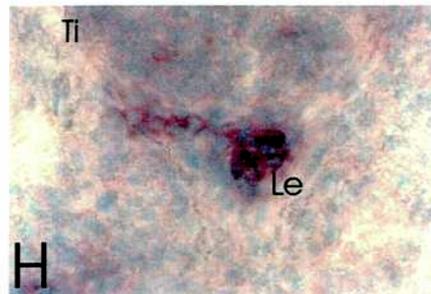
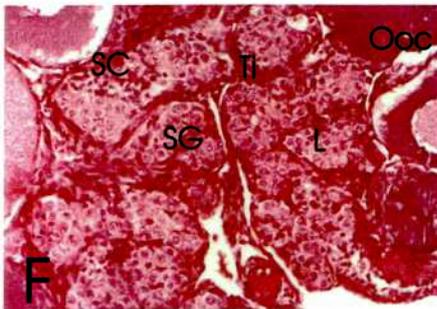
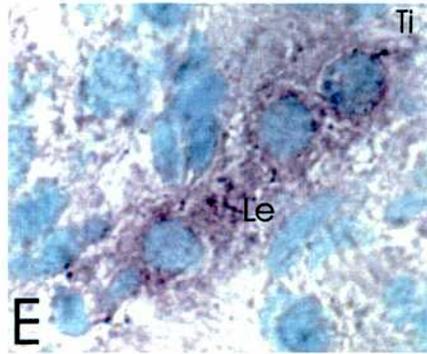
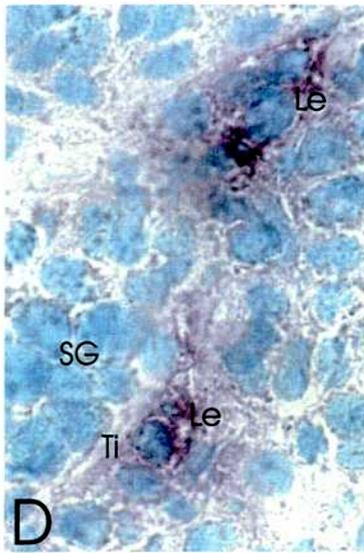
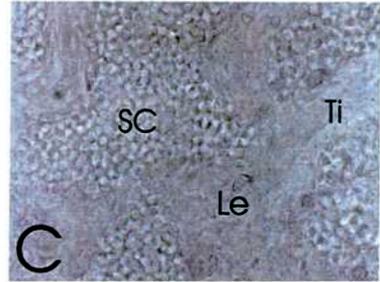
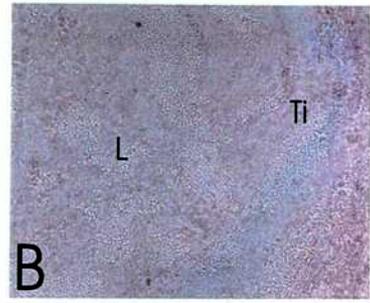
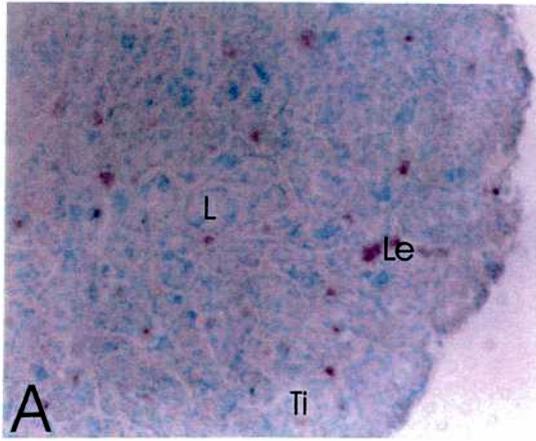
La identificación se realizó tanto para machos primarios como secundarios y revertantes y aún en el periodo invernal lo cual confirma la función esteroideogénica de este tipo celular. Los controles específicos fueron negativos en todos los casos (Figura 40).

No se detectó marca alguna en las células de Sertoli utilizando esta técnica, en ninguna época del año para ambos tipos de machos.

**Figura 40.**

Células de Leydig  $3\beta$ -HSD positivas. **A)** Medio de reacción completo, contra coloreado con verde luz. La reacción positiva se manifiesta por el color violáceo (macho secundario). 100x. **B)** Control sin esteroide. 40x. **C)** Control sin NAD. 200x. **D)** y **E)** Macho primario y secundario respectivamente. Detalles de las células de Leydig con deposición de la sal de tetrazolio en su citoplasma. 600x. **F)** Gónada en pleno proceso de reversión. Hematoxilina - Eosina. 200x. **G)** Idem con la técnica para detección de  $3\beta$ -HSD. Las zonas violáceas corresponden a las células de Leydig del intersticio dentro del tejido ya diferenciado a macho secundario. 200x. **H)** Detalle de las mismas (250x).

L: lóbulo; Le: células de Leydig; Ooc: oocitos; SC: espermatoцитos I; SG: espermatogonias; Ti: tejido intersticial.



## CONCLUSIONES y DISCUSIÓN

Durante el ciclo anual fueron descritas cinco clases reproductivas. Estas estuvieron basadas sobre la ocurrencia de cambios naturales en el epitelio germinal y en la preponderancia de los diferentes estadios de la espermatogénesis. Éstas son similares a lo que ocurre durante el ciclo reproductivo anual en *Centropomus undecimalis* (common snook) (Perciformes) (Taylor y col., 1998; Grier y Taylor, 1998), la primer especie en la cual los cambios en el epitelio germinal fueron utilizados para definir clases reproductivas.

Los cambios testiculares que ocurren durante el ciclo anual en *S. marmoratus* y *C. undecimalis* proveen criterios nuevos y significativos para definir las mismas clases reproductivas que probablemente ocurren en otros teleósteos. El epitelio germinal fue definido por Grier (1993) y recientemente redefinido por él (2000) de modo que conforma la definición de epitelio de un libro de texto y es aplicable entre sexos y a través de los taxa de cordados. Como tal, el epitelio germinal testicular está constituido por células de Sertoli y células germinales y apoya sobre una membrana basal, la cual lo separa del tejido intersticial. En el epitelio germinal testicular de los peces teleósteos, el esperma madura en espermatozoides (Callard, 1991; Grier, 1993): un conjunto de células germinales madurando sincrónicamente, que están rodeadas por procesos de las células de Sertoli.

En *S. marmoratus* las clases regresada y maduración temprana, presentan un epitelio germinal continuo. En la maduración media están presentes ambos tipos de epitelio, continuo y discontinuo, éste se vuelve discontinuo cerca de los conductos eferentes. En la maduración final y en regresión el epitelio es totalmente discontinuo.

En este estudio un epitelio germinal permanente alterna entre continuo y discontinuo durante y entre ciclos reproductivos anuales. El crecimiento de los lóbulos se lleva a cabo por medio de ramificaciones en las clases regresada, maduración temprana, media y final. Este proceso de bifurcaciones azarosas permite la elongación de los lóbulos desde la región proximal hacia la distal y parecería que el tejido intersticial crece en sentido opuesto.

Durante la clase de maduración final se observó fácilmente que sólo una pequeña porción de los lóbulos testiculares está involucrada en la espermatogénesis. En este período,

los testículos alcanzan su máximo tamaño e IGS, pero no ocurre lo mismo en *C. undecimalis*, donde los testículos alcanzan su máximo tamaño durante la maduración media (Grier y Taylor, 1998).

La siguiente tabla resume las características utilizadas para definir las clases reproductivas:

| CLASE               | <u>EPITELIO GERMINAL</u>                                | LUZ EN LÓBULOS                                                                  | ESPERMA           | CONDUCTOS EFERENTES.              | PREPONDRANCIA CÉL. GERMINAL. |
|---------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| REGRESADA           | Continuo                                                | Discontinua o ausente                                                           | esperma residual  | luz reducida                      | SPG                          |
| MADURACIÓN TEMPRANA | Continuo                                                | Ausente                                                                         | ---               | luz más amplia                    | SPG, SPC I y II              |
| MADURACIÓN MEDIA    | - Reg. prox: discontinuo<br><br>- Reg. distal: continuo | - Reg. prox: continua con los conductos eferentes<br><br>- Reg. distal: ausente | cantidad reducida | luz con algo de esperma           | SPG, SPC I, II , SPD y SPZ   |
| MADURACIÓN FINAL    | discontinuo                                             | Continua con cond. efer.                                                        | máxima cantidad   | luz muy amplia con esperma        | SPZ                          |
| EN REGRESIÓN        | discontinuo                                             | presente                                                                        | esperma residual  | luz reducida con esperma residual | SPG                          |

La liberación del esperma (o espermiación) es un proceso complicado porque los lóbulos están cerrados y no hay una luz continua entre ellos y los conductos eferentes. Las paredes de los lóbulos adyacentes se fusionan gradualmente desde los lóbulos proximales hacia la periferia, creando numerosas anastomosis laterales de considerable complejidad,

dando lugar a un camino para el egreso del esperma. En *S. marmoratus* éstas anastomosis laterales se extienden más periféricamente que en *C. undecimalis*. (Grier y Taylor, 1998). En los machos primarios las anastomosis se forman más tempranamente, a diferencia de lo que ocurre en *C. undecimalis* que se forman a partir de la maduración media.

Es bastante común encontrar esperma residual durante la clase en regresión, esto se debe a que la producción de esperma es mayor que el eyaculado, como en *C. undecimalis*. Esto varía entre especies y aún dentro de la misma especie (Billard, 1990). En *C. undecimalis* hay mayor cantidad de esperma que en *S. marmoratus* y gran parte de él puede salir desde el testículo por un proceso enteramente pasivo, después de la estación de cría (Grier y Taylor, 1998). Es posible que ocurra un proceso similar en *S. marmoratus*. Luego, los testículos estarán listos para la restauración gonadal a través de las divisiones mitóticas de las SPG y las células de Sertoli y el proceso de crecimiento lobular, por medio de ramificaciones.

En muchos peces, se encuentra frecuentemente una población residual de células germinales (SPG) dentro de los lóbulos después de la estación de puesta (Jones, 1949; Henderson, 1962; Rai, 1965; Ruby y McMillan, 1970; Shresta y Khanna, 1976). Éstas cumplen la función de repoblar los lóbulos testiculares luego de la regresión y así reiniciar el próximo ciclo reproductivo. Este proceso es mucho más rápido en *S. marmoratus* que en *C. undecimalis* (Perciformes) y en *Gambusia affinis* (Atheriniformes).

En cada ciclo espermatogénico sucesivo, debe ocurrir una renovación continua de las poblaciones de células de Sertoli y germinales. En *S. marmoratus* no se encontraron evidencias de un total reemplazo de células de Sertoli y SPG, entre una estación de cría y la siguiente. Algunas de estas células persisten (clase en regresión). Se observan SPG esparcidas a lo largo de las paredes de los lóbulos, pero esto es bastante distinto en *C. undecimalis*, donde sólo se encuentran conjuntos periféricos de células espermatogoniales (Grier y Taylor, 1998). En ambos casos, las SPG son el origen de la renovación de las células germinales en los testículos, entre estaciones de cría.

En los peces Perciformes, un significativo cambio morfológico tiene lugar en el epitelio germinal entre estaciones reproductivas: el testículo primero sirve como un órgano para la producción de esperma, luego para la producción y almacenaje, y finalmente para

almacenaje, antes de la regresión. Estos cambios en la función son observados histológicamente y permiten definir tipos de epitelio germinal continuo y discontinuo (Grier, 1993) y utilizar estos cambios para definir clases reproductivas (Grier y Taylor, 1998; Taylor y col. 1998). Estas observaciones son mucho más significativas cuando son aplicadas, aquí, al ciclo testicular anual de *S. marmoratus*, un pez que está separado evolutivamente de los Perciformes. A pesar de la divergencia evolutiva, el mecanismo básico de la maduración testicular ha sido retenido entre estas dos especies de peces.

Este hecho y la definición y reconocimiento de tipos de epitelios continuo y discontinuo, permite pensar que la evolución de un epitelio germinal permanente coincide con la evolución de un compartimiento germinal permanente en los testículos de los cordados (Grier y Taylor, 1998). Por lo tanto, en los cordados, aparece primero un epitelio germinal permanente en los peces y no en los anfibios como había sido originalmente reportado por Lofts (1974, 1984, 1987).

Respecto de las células de Sertoli, algunos autores opinan que degeneran luego de la espermiación, como en *Gambusia affinis* (Melden, 1950; Billard, 1969a; 1970a). Otros autores indican que estas células podrían transformarse en células de los conductos eferentes (incluyendo como conducto a la luz de los lóbulos que se comunica finalmente con ellos) (Van der Hurk y col., 1974; Grier, 1981; 1980). Según Grier (1993), los conductos eferentes de los Poecilidae son una región de recambio celular involucrando la hipertrofia de las células de Sertoli y la transformación en células del conducto. En *S. marmoratus*, las células de Sertoli permanecen entre estaciones reproductivas.

Los centros melanomacrofágicos son comunes durante la clase en regresión y se encuentran en el tejido intersticial. La presencia de estos centros, podría ser parte de un mecanismo generalizado de regresión gonadal en peces y en otros animales con ciclo reproductivo anual.

La espermatogénesis se desarrolla a través del año y esto fue puesto en evidencia por la detección de división celular utilizando inmunohistoquímica. La técnica de PCNA indicó que durante las clases regresada y de maduración temprana hay proliferación de espermatogonias y espermatocitos. Esta conclusión coincide con la de Kajiura-Kobayashi y colaboradores (1999) quienes encontraron que, en la *Anguilla japonica* (anguila japonesa) hay un aumento de ciclinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> durante la proliferación gonial que alcanza una meseta

cuando las células espermatogoniales se diferencian en espermatocitos. Todos estos resultados también confirman que en *S. marmoratus* la espermatogénesis es un proceso continuo. Las células de Sertoli también presentaron respuesta positiva con la técnica de PCNA, quedando demostrado que hay un repoblamiento de los lóbulos testiculares y por lo tanto una contribución a la formación de nuevos espermatocitos. El hecho de no encontrar marca más allá del estadio de SPC I temprano, en las células de Sertoli, coincide con lo definido por Schultz y col., (2000). Ellos concluyeron que la proliferación de las células de Sertoli cesa cuando el espermatocito se aproxima al número de células germinales predecible. Por otro lado, especularon que la regulación de la proliferación de las células de Sertoli está funcionalmente relacionada con la de la espermatogénesis. Aparentemente, están asociadas a un número específico y finito de células germinales. En los peces proliferan durante la espermatogénesis temprana y pueden constituir otra población de células madre.

La marca obtenida para  $3\beta$ -HSD en células del tejido intersticial (células de Leydig), confirma que éstas son esteroideogénicas. Estos resultados concuerdan con los observados para ME (capítulo I). La presencia de marca positiva en los revertantes, coincide con lo observado en *M. albus* (Yeung y col., 1975), donde se demostró inmunohistoquímicamente la presencia de  $3\beta$ -HSD, así como un aumento de los andrógenos durante la reversión sexual. Por otro lado, en *S. marmoratus* se encontró marca durante todo año en ambos tipos de machos, contrariamente a lo que ocurre en otras especies como *O. mykiss* que sólo presentó marca cuando hay SPZ presentes en el testículo (Van der Hurk, 1978).

## **EL CONCEPTO UNIFICADOR**

El testículo de los cordados probablemente ha evolucionado desde los tipos preespermatoocístico (*Agnatha*) y luego a los tipos tubular anastomosado y lobular, en teleósteos (Grier, 1993). Esta hipótesis de la evolución del testículo de los cordados ha permitido unificar conceptos de nomenclatura describiendo la morfología testicular a través del *phylum*. Como científicos, nosotros podríamos utilizar una nomenclatura uniforme para mejorar el entendimiento de la morfología.

Los criterios histológicos utilizados aquí, para definir clases reproductivas son bien notorios y podrían ser aplicados a otras especies de teleósteos. La extensión con la cual estos cambios reflejan el ciclo testicular anual en otros teleósteos, está a consideración.

**CAPITULO III**

**CARACTERIZACIÓN DE LAS VARIANTES  
MOLECULARES DE GnRH.  
INDUCCIÓN DE LA ESPERMIACIÓN.**

## INTRODUCCIÓN

### **LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS (GnRH).**

En los peces teleósteos, como en el resto de los vertebrados, la regulación de la actividad reproductiva es ejercida por el sistema nervioso central (S.N.C.). El cerebro, como un integrador de las señales provenientes del exterior, está altamente comprometido en todos los pasos del ciclo reproductivo (Kah y col., 1993).

En los últimos diez años el avance de las investigaciones permitió precisar el grado y tipo de participación de diferentes sistemas neuronales y territorios cerebrales implicados en el control de crecimiento y maduración de las gónadas y del comportamiento sexual (Kah y col., 1993; Kawachi, 1994; Fradinger y col., 2000).

Las distintas variantes de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) son sintetizadas en distintas áreas cerebrales (Muske, 1997). Las neuronas que expresan GnRH ubicadas en el área preóptica, alcanzan la glándula hipófisis directamente (como en peces teleósteos) o a través del sistema porta-hipofisario (como en vertebrados tetrápodos) (Peter y col., 1990).

Los peces teleósteos carecen de un sistema vascular portal para transportar neuropéptidos, neurohormonas o neurotransmisores desde el cerebro hasta la adenohipófisis. Las células adenohipofisarias están directamente inervadas por fibras hipotalámicas que forman la denominada neurohipófisis anterior (Peter y col., 1990).

Es sabido que son captadas diferentes señales por el S.N.C. y estimulan la síntesis y secreción de GnRH. En peces, esta molécula es liberada por fibras nerviosas provenientes de células neurosecretoras preóptico-hipotalámicas, y actúan directamente sobre la hipófisis. Es importante destacar que GnRH también puede expresarse en regiones extrahipotalámicas, como el bulbo olfatorio, telencéfalo anterior, el núcleo del nervio terminal y el techo del mesencéfalo (King y Millar, 1997; Muske 1997; Stefano y col., 2000). GnRH es la principal molécula regulatoria en la reproducción de los vertebrados. La misma es vertida hacia la hipófisis anterior estimulando la secreción de las gonadotrofinas hipofisarias (GtHs), las cuales vía torrente sanguíneo, tendrán como órgano blanco principal a las gónadas. GnRH, además estimula, en algunos peces teleósteos, la liberación de la hormona de crecimiento (GH) (Melamed y col., 1995; Marchant y col., 1989b;), de prolactina (PRL) (Weber y col., 1997) y de somatolactina (SL) (Kakisawa y col., 1997; Stefano, 1999; Vissio y col. 1999).

En forma simultánea se desarrolla una compleja red de controles inhibitorios que actúan a modo de retroalimentación ("feedback") regulando todos los mecanismos que componen el proceso reproductivo. Uno de estos sistemas de inhibición estaría dado, por la acción de la dopamina que se postula como el inhibidor primario de la liberación basal de gonadotrofinas (más precisamente GtH-II, hormona homóloga a LH de vertebrados tetrápodos) (Yu y Peter, 1990; 1992) tanto en el cerebro como en hipófisis (Peter y col., 1991). Existen también otros factores que intervienen en este sistema de controles, como neurohormonas y esteroides sexuales (Guiguen y col., 1993; Trudeau y col. 1991, 1993).

Respecto de la secreción de GnRH a nivel gonadal en vertebrados inferiores, existirían sólo algunos datos preliminares (Sherwood y col., 1997), sin embargo Pati y Habibi en 1998, identificaron sGnRH (variante denominada "salmón") (ver más adelante), por análisis de su secuencia en el ovario de *Carassius auratus* (goldfish). Además se ha demostrado la presencia de sitios de unión a GnRH en ovario de goldfish, carpa y bagre (Pati y Habibi, 1992; 1993a y b; Habibi y Pati, 1993b; Habibi y col., 1994;) así como en testículos de varias especies de anfibios (Chieffi, y col., 1991). También, se ha detectado ARN mensajero de GnRH en las gónadas de un pez del Superorden Paracanthopterygii, *Porichthy notatus* (Grober y col., 1995) y en el ovario de *Carassius auratus* (Lin y col., 1996).

## LA MOLÉCULA DE GnRH

El primer factor neuroendócrino reconocido como estimulador de gonadotrofinas fue la "hormona liberadora de gonadotrofinas" de mamíferos llamada mGnRH. A partir de la caracterización de la estructura primaria de GnRH en porcinos y ovinos (mGnRH) (Matsuo y col., 1971; Burgus y col., 1972), se logró identificar y secuenciar otras 13 variantes en vertebrados y procordados.

Las distintas variantes de GnRH presentes en los vertebrados, parecen haber evolucionado a partir de cambios producidos en nucleótidos de ADN y no a partir de empalmes ("splicings") diferenciales del ARN mensajero o de un procesamiento post-traducciona (Sherwood, 1987). Como otros neuropéptidos, GnRH es producto del clivaje de una molécula precursora de mayor tamaño que es sintetizada a partir de ARN mensajero en el cuerpo neuronal.

Las hormonas liberadoras de gonadotrofinas son neuropéptidos constituidos por diez aminoácidos y a pesar que se presume la existencia de un número mayor de

variantes, hasta el presente se han reconocido y secuenciado 14 formas de esta molécula, 12 en vertebrados y 2 en procordados; siendo la variante denominada “salmón”, sGnRH la primera que se identificó en peces.

El nombre de cada una de estas variantes proviene de la especie en la que fue descrita por primera vez (Tabla I).

**Tabla I:** denominación de cada variante y primera referencia

|             |             |                                          |
|-------------|-------------|------------------------------------------|
| Mammalia    | (mGnRH)     | Matsuo y col., 1971; Burgus y col., 1972 |
| Chicken I   | (cGnRH-I)   | King y Millar, 1982a y 1982b             |
| Seabream    | (sb GnRH)   | Powell y col., 1994                      |
| Catfish     | (cfGnRH)    | Ngamvongchon y col., 1992a               |
| Salmon      | (sGnRH)     | Sherwood y col., 1983                    |
| Herring     | (hrGnRH)    | Carolsfeld y col., 2000                  |
| Guinea-pig  | (gp GnRH)   | Jimenez-Liñan y col., 1997               |
| Dogfish     | (dfGnRH)    | Lovejoy y col., 1992a                    |
| Chicken II  | (cGnRH-II)  | Miyamoto y col., 1984                    |
| Lamprey I   | (lGnRH-I)   | Sherwood y col., 1986a.                  |
| Lamprey III | (lGnRH-III) | Sower y col., 1993                       |
| Tunicate I  | (tGnRH-I)   | Powell y col., 1996a                     |
| Tunicate II | (tGnRH-II)  | Powell y col., 1996a                     |
| Pejerrey    | (pjGnRH)    | Montaner y col., 2000.                   |

A su vez, se identificó la expresión de una variante hidroxilada de mGnRH: (Hyp<sup>9</sup>)mGnRH, originada por una modificación post-traducciona en anfibios y mamíferos (Gautron y col., 1991).

Se considera que todas estas variantes pertenecen a la misma familia por poseer las siguientes características comunes:

- a) son deca péptidos.
- b) El extremo carboxilo terminal (-COOH) se encuentra amidado (Gly-amida) y el amino terminal (-NH<sub>2</sub>) está ciclado formando un piroglutamato (pGlu).

e) Cuatro residuos en posición 1, 4 ,9 y 10 están conservados (Jiménez Liñán y col., 1997; Montaner y col., 2000).

En la Tabla II se indica la secuencia primaria de estos neuropéptidos:

**TablaII:** secuencia primaria de las 14 variantes de GnRH

| Posic. Aminoac. | 1    | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10 - NH <sub>2</sub> |
|-----------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----------------------|
| mGnRH           | pGlu | His | Trp | Ser | Tyr | Gly | Leu | Arg | Pro | Gly-NH <sub>2</sub>  |
| cGnRH-I         | pGlu | His | Trp | Ser | Tyr | Gly | Leu | Gln | Pro | Gly-NH <sub>2</sub>  |
| sbGnRH          | pGlu | His | Trp | Ser | Tyr | Gly | Leu | Ser | Pro | Gly-NH <sub>2</sub>  |
| cfGnRH          | pGlu | His | Trp | Ser | His | Gly | Leu | Asn | Pro | Gly-NH <sub>2</sub>  |
| sGnRH           | pGlu | His | Trp | Ser | Tyr | Gly | Trp | Leu | Pro | Gly-NH <sub>2</sub>  |
| hrGnRH          | pGlu | His | Trp | Ser | His | Gly | Leu | Ser | Pro | Gly-NH <sub>2</sub>  |
| gpGnRH          | pGlu | Tyr | Trp | Ser | Tyr | Gly | Val | Arg | Pro | Gly-NH <sub>2</sub>  |
| dfGnRH          | pGlu | His | Trp | Ser | His | Gly | Trp | Leu | Pro | Gly-NH <sub>2</sub>  |
| cGnRH-II        | pGlu | His | Trp | Ser | His | Gly | Trp | Tyr | Pro | Gly-NH <sub>2</sub>  |
| lGnRH-III       | pGlu | His | Trp | Ser | His | Asp | Trp | Lys | Pro | Gly-NH <sub>2</sub>  |
| lGnRH-I         | pGlu | His | Tyr | Ser | Leu | Glu | Trp | Lys | Pro | Gly-NH <sub>2</sub>  |
| tGnRH-I         | pGlu | His | Trp | Ser | Asp | Tyr | Phe | Lys | Pro | Gly-NH <sub>2</sub>  |
| tGnRH-II        | pGlu | His | Trp | Ser | Leu | Cys | His | Ala | Pro | Gly-NH <sub>2</sub>  |
| pjGnRH          | pGlu | His | Trp | Ser | Phe | Gly | Leu | Ser | Pro | Gly-NH <sub>2</sub>  |

La conservación de los extremos amino y carboxilo sugiere que estas regiones son relevantes para la unión al receptor, la resistencia a la degradación enzimática y el disparo de los eventos mediados por el receptor en la liberación de las gonadotrofinas (ver revisión en Stefano, 1999). Tomadas en conjunto, estas características hacen pensar que GnRH es una molécula asociada a la reproducción que apareció hace al menos 500 millones de años con el surgimiento de los agnatos.

### **DISTRIBUCIÓN TAXONÓMICA DE GnRH**

Como se mencionara antes, las variantes de GnRH tomaron su nombre de la especie en la que fue descrita por primera vez. Posteriormente se demostró que muchas especies pertenecientes a distintos grupos de vertebrados expresaban la misma variante. La mayor parte de estos estudios se realizaron, utilizando cromatografía líquida de alta

presión (HPLC) para separar las diferentes formas de GnRH; radioinmunoensayos (RIA) utilizando antisueros específicos; bioensayos en cultivos primarios de células hipofisarias y ensayos de unión al receptor.

Estos análisis dieron a conocer las formas de GnRH de un gran número de especies, y por ende aportaron valiosa información acerca de la distribución taxonómica de las diferentes variantes. Muchos de estos datos fueron confirmados definitivamente con la determinación directa de la secuencia aminoacídica.

En agnatos, se identificaron tres variantes de GnRH, denominadas IGnRH-I, II y III. Dos de ellas: IGnRH-I y IGnRH-III han sido ya secuenciadas (Sherwood y col., 1986a; Sower y col., 1993) mientras que de la variante IGnRH-II se conoce su composición pero no aún su secuencia (Sherwood y col., 1993a).

En peces cartilaginosos, se identificaron tanto cGnRH-II como dfGnRH y formas nuevas aún no secuenciadas (Powell y col., 1986a; Lovejoy y col., 1992a y b; 1993). En peces teleósteos, se identificó la presencia de cGnRH-II junto con mGnRH, sGnRH, cfGnRH, sbGnRH o una variante nueva de GnRH (Amano y col., 1986; Powell y col., 1986a; Yu y col., 1988; Ngamvongchon y col., 1992a; Gothilf y col., 1993; Joss y col., 1994; King 1985, 1990b, 1995a; Sherwood y col., 1983; 1984; 1989; 1991;). En estos últimos años se ha comprobado que muchas especies expresan tres variantes de GnRH: cGnRH-II, sGnRH, con sbGnRH, hGnRH, o pjGnRH (sbGnRH: Powell y col., 1994, 1997; Somoza, 1994; hrGnRH: Carlosfeld y col., 2000; pjGnRH: Montaner y col., 2000; Okubo y col., 2000).

En los anfibios estudiados, se determinó la expresión de tres formas de GnRH: cGnRH-II, mGnRH, y una variante nueva con propiedades similares a sGnRH (King y Millar, 1986; Conlon y col., 1993; Northcutt y col., 1994; Muske y Moore 1994; Sherwood y col., 1986b; Somoza y col., 1996; Miranda y col., 1998).

En los reptiles estudiados, predominan cGnRH-I y cGnRH-II, aunque también existen evidencias de la presencia de variantes nuevas (Powell y col., 1985; 1986b; Sherwood y col., 1988; Tsai y Licht, 1993; Montaner y col., 2000). Mientras que en aves (Aves), sólo se describió la presencia de cGnRH-I y cGnRH-II (King y col., 1982a; 1982b; Miyamoto y col., 1984; Powell y col., 1987; Mikami y col., 1988; Millan y col., 1993).

En mamíferos, se han identificado tres formas moleculares de GnRH: mGnRH, cGnRH-II y gpGnRH. En varias especies de metaterios (King y col., 1989; 1990a; 1994) y en algunas especies de euterios de evolución temprana como los insectívoros,

(Dellovade, y col., 1993; Kasten, y col., 1996) están presentes cGnRH-II y mGnRH, mientras que en la mayoría de las especies de euterios más evolucionados ha sido identificada solamente mGnRH (King y col., 1988; Kelsall, y col., 1990; Gautron, y col., 1991); aunque recientemente se determinó la presencia de cGnRH-II en distintas especies de este grupo (Lesheid y col., 1997; Chen y col., 1998; White y col., 1998a y b; Montaner y col., 1998; 1999).

En la tabla III se presentan los datos de distribución taxonómica de GnRH para peces cartilagosos y óseos.

**Tabla III:** Distribución taxonómica de GnRH para peces.

| <b>Especies</b>                   | <b>Variante Molecular</b> | <b>Tipo de identificación</b> | <b>Autores</b>                                 |
|-----------------------------------|---------------------------|-------------------------------|------------------------------------------------|
| <b>Vertebrata</b>                 |                           |                               |                                                |
| <b>Chondrichtyes</b>              |                           |                               |                                                |
| <i>Hydrolagus colliei</i>         | CII                       | P                             | Lovejoy y col., 1991a                          |
| <i>Torpedo marmorata</i>          | CII - Df                  | H y R                         | King y col., 1992                              |
| <i>Squalus acanthias</i>          | CII - Df                  | P                             | Lovejoy y col., 1992                           |
| <i>Scyliorhinus canicula</i>      | CII - M - S - Df ?        | H y R                         | D'Antonio y col., 1995                         |
| <i>Porderma africanum</i>         | CII                       | ?                             | Powell y col., 1986                            |
| <b>Osteichtyes</b>                |                           |                               |                                                |
| <i>Calamoichthyes calabaricus</i> | CII - M                   | H y R                         | Sherwood y col., 1991                          |
| <i>Acipenser guldustaedi</i>      | CII - M                   | P                             | Lescheid y col., 1995                          |
| <i>Acipenser transmontanus</i>    | CII - M                   | H y R                         | Sherwood y col., 1991                          |
| <i>Lepisosteus spatula</i>        | CII - M                   | H y R                         | Sherwood y col., 1991                          |
| <i>Anguilla anguilla</i>          | CII - M                   | H y R                         | King y col., 1990                              |
| <i>Clarias gariepinus</i>         | CII - Cf                  | H y R                         | Sherwood y col., 1989                          |
| <i>Clarias macrocephalus</i>      | CII - Cf                  | P                             | Ngamvongchon y col., 1992a                     |
| <i>Clupea harems pallasii</i>     | CII - S - H               | P                             | Sherwood y col., 1997b                         |
| <i>Chanos chanos</i>              | CII - S                   | H y R                         | Sherwood y col., 1984                          |
| <i>Carassius auratus</i>          | CII - S                   | H y R                         | Yu y col., 1988                                |
| <i>Synbranchus marmoratus</i>     | CII - S                   | H y R                         | Lo Nostro y col., 1996                         |
| <i>Onchorynchus keta</i>          | CII - S                   | P                             | Sherwood y col., 1983                          |
| <i>Onchorynchus masou</i>         | CII - S                   | H y R                         | Amano y col., 1992                             |
| <i>Salmo gairdneri</i>            | CII - S                   | H y R                         | Sherwood y col., 1984;<br>Okusawa y col., 1990 |

|                                     |                |             |                                              |
|-------------------------------------|----------------|-------------|----------------------------------------------|
| <i>Brachydanis rerio</i>            | CII - S        | H y R       | Powell y col., 1996                          |
| <i>Orzias latipes</i>               | CII - S        | H y R       | Powell y col., 1996                          |
| <i>Sebastes rastrelliger</i>        | CII - S - Sb   | H y R       | Powell y col., 1996                          |
| <i>Merluccius capensis</i>          | CII - S        | H y R       | King y Millar, 1985                          |
| <i>Gadus morhua morhua</i>          | CII - S        | P           | Wu y col., 1986                              |
| <i>Tilapia sparrmanii</i>           | CII - S ?      | H y R       | King y Millar, 1985                          |
| <i>Coris julis</i>                  | CII - S        | H y R       | Powell y col., 1986                          |
| <i>Centropomus striatus</i>         | CII - S        | H y R       | Sherwood y col., 1993                        |
| <i>Mugil cephalus</i>               | CII - S - Sb - | H y R       | Sherwood y col., 1984                        |
| <i>Piaractus mesopotamicus</i>      | CII - S - Sb - | P           | Powell y col., 1997                          |
| <i>Prochilodus lineatus</i>         | CII - S - Sb   | H y R       | Somoza y col., 1994                          |
| <i>Centropomus undecimalis</i>      | CII - S - Sb   | H y R       | Sherwood y col., 1993                        |
| <i>Haplochromis burtoni</i>         | CII - S - Sb   | H y R; cDNA | Powell y col., 1995;<br>White y col., 1995   |
| <i>Spaurus aurata</i>               | CII - S - Sb   | H y R; cDNA | Powell y col., 1994;<br>Gothilf y col., 1995 |
| <i>Morone saxalatis</i>             | CII - S - Sb   | cDNA        | Gothilf y col., 1995                         |
| <i>Pseudochaemicthys georgianus</i> | CII - S - Sb ? | H y R       | Miranda y col., 1998                         |
| <i>Chaenocephalus aceratus</i>      | CII - S - Sb ? | H Y R       | Miranda y col., 1998                         |
| <i>Notothenia rossi</i>             | CII - S - Sb   | H y R       | Miranda y col., 1998                         |
| <i>Neroceratodus forstei</i>        | CII M          | H y R       | Joss y col., 1994                            |
| <i>Protopterus amnactens</i>        | CII - M -      | H y R       | King y col., 1995                            |
| <i>Lepomis gibbosus</i>             | CII - S - Sb   | H y R; P.   | Powell y col., 1995                          |
| <i>Odontesthes bonariensis</i>      | CII - S - pj   | P           | Montaner y col., 2000                        |
| Herring                             | CII - S - hr   | P           | Carolsfeld y col., 2000                      |

#### REFERENCIAS:

?: forma no identificada. Identificación: **H y R**: HPLC y RIA respectivamente; **P**: secuenciación de péptidos; **cDNA**: secuenciación de cDNA; **ICQ**: técnicas inmunocitoquímicas.

#### GnRH EN PECES

GnRH es considerada la “hormona reproductiva” y cada especie puede expresar más de una variante de GnRH. En la mayoría de los vertebrados, incluso en los humanos, es sabido que coexistirían al menos dos de estas formas en el sistema nervioso: una altamente conservada, cGnRH-II, mientras que las otras formas varían de acuerdo con la especie (King y Millar, 1985; 1992; Lepretre y col., 1993; Stefano, 1993; Sherwood y col. 1993b; Powell y col. 1994, 1996a y b; Somoza y col., 1994), aunque no todas las formas serían reproductivamente activas.

En teleósteos, la distribución neuroanatómica varía en las diferentes especies y por lo general cGnRH-II se expresa en cuerpos neuronales localizados en el diencefalo posterior o cerebro medio mientras que las otras formas de GnRH descritas (sGnRH, mGnRH, cfGnRH, hrGnRh y pjGnRH) se encuentran asociadas con el ganglio del nervio terminal o con el núcleo preóptico paraventricular.

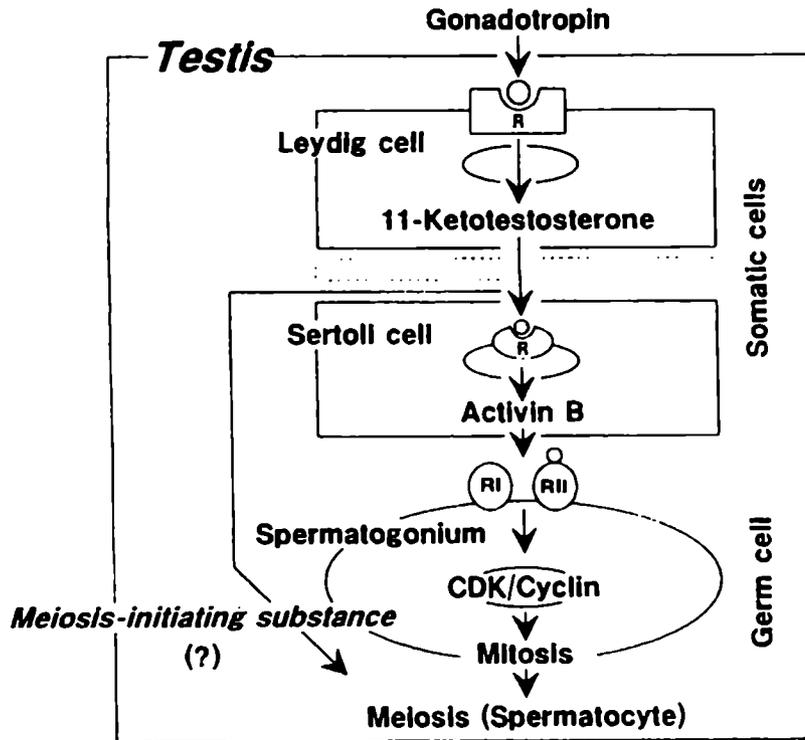
Como se mencionara anteriormente, GnRH cumple un rol fundamental no sólo en el desarrollo y el mantenimiento de la función reproductiva por la estimulación de la síntesis y liberación de las gonadotrofinas (GtH I y GtH II) hipofisarias sino también en los cambios comportamentales relacionados con la reproducción (Trudeau y col., 1997). Las diferencias en la ontogenia y la localización de diferentes formas de GnRH dentro de una misma especie, indican que esta molécula podría encargarse de una variedad de funciones reproductivas en un organismo.

Así mismo, las bases fisiológicas de la reversión sexual dentro del orden han sido objeto de numerosos estudios (Chan y col., 1975; Chan 1977; Chan and Yeung, 1983; Tao y col., 1993; Yeung y col. 1993), pero este proceso aún no ha sido claramente entendido. En especies relacionadas como *Monopterus albus* (Zuiew), ha sido demostrado que GnRH podría jugar un importante rol en el proceso de inducción de la reversión sexual (Tao y col., 1993) aunque algunos autores no lograron demostrar el mismo efecto utilizando otros análogos de GnRH en un esquema similar (Yeung y col., 1993).

Vissio y colaboradores (1996), realizaron el análisis inmunocitoquímico de la adenohipófisis de *S. marmoratus*, detectando la presencia de células productoras de prolactina (PRL), corticotrofinas (ACTH), hormona de crecimiento (GH), células productoras de tirotrofinas (TSH) y gonadotrofinas (GtH), detectadas en el área central de la *pars distalis proximal* y en el borde externo de la *pars intermedia*.

Suzuki y col., (1988) y Nozaki y col., (1990), reportaron que las GtH I es predominante en la hipófisis de los teleósteos durante la vitelogénesis y la espermatogénesis temprana, mientras que la expresión de GtH II es mayor al momento de la ovulación y/o espermiación. Así mismo, las diferencias en las secreciones de poblaciones de células productoras de GtH han sido relacionadas con los cambios estacionales en *Oncorhynchus masou* (Salmoniformes) (Amano y col., 1993).

En el siguiente esquema, tomado de Nagahama (2000), se ilustran los posibles caminos de varios mediadores hormonales a partir del efecto de las gonadotropinas, en la espermatogénesis de *Anguila japonica* (Anguiliformes):



## INDUCCIÓN DE LA ESPERMIACIÓN

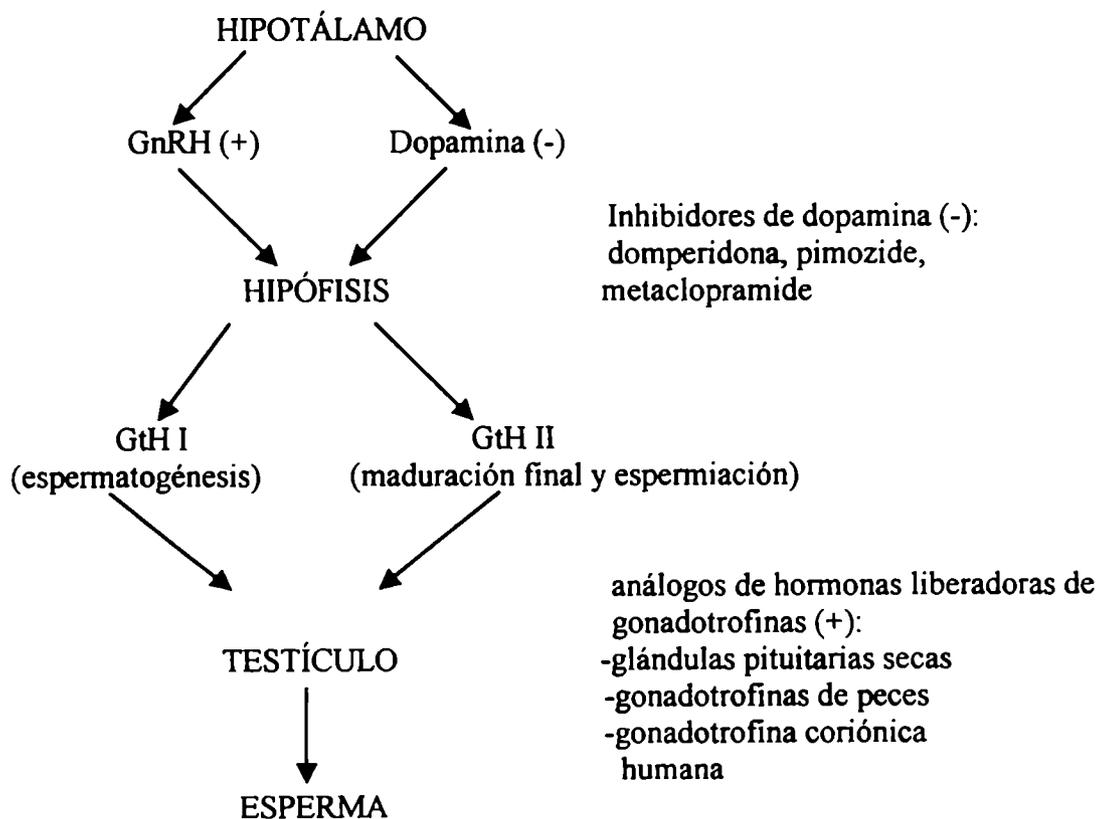
La reproducción sexual es uno de los más intrigantes y fascinantes fenómenos que pueden ser observados en la naturaleza. Ella permite que una pareja pueda dar nacimiento a nuevos individuos, los cuales llevan la misma información genética y contribuirán a la supervivencia de las especies. Por lo tanto el éxito de la reproducción necesita no sólo de interacciones complejas a lo largo del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, en orden de establecer un estatus endocrino apropiado dentro del individuo, sino que también requiere de la sincronización entre dos individuos al tiempo de la puesta. Esto se llevará a cabo por respuestas apropiadas de comportamiento y endocrinas por cada miembro de la pareja, a las señales emitidas por el otro y por el ambiente que los rodea (Kah y col., 1993).

En la naturaleza, el desarrollo reproductivo y la puesta de los peces están controlados por factores ambientales tales como temperatura, fotoperíodo, nutrición, calidad del agua (salinidad, nivel de oxígeno, etc.) y presencia de un sustrato para la puesta. En acuicultura, no siempre es posible o económicamente factible imitar las

condiciones ambientales, especialmente cuando algunas especies son mantenidas a una distancia considerable de su localización geográfica original. Así las manipulaciones endocrinas o una combinación de endocrinas y ambientales son utilizadas para facilitar la reproducción.

El sistema endocrino, el cual regula el desarrollo reproductivo, es conocido como eje hipotálamo-hipofisario-gonadal. Los cambios en los factores ambientales, son detectados por el sistema sensorial y transmitidos al cerebro. El hipotálamo, produce variantes moleculares de hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) y factores que inhiben la liberación de gonadotrofinas (dopamina), los cuales regulan la síntesis y liberación de las gonadotrofinas (GtH) por la hipófisis. Las gonadotrofinas son secretadas a la sangre, las cuales llegan al testículo donde ellas estimulan la síntesis de andrógenos como 11-KT (11 cetotestosterona), que está involucrada en el proceso de espermatogénesis, y progestágenos tales como  $17\alpha,20\beta$  dihidroxiprogesterona implicada en la producción de esperma maduro.

En el siguiente esquema se representa el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal en peces y medios para estimular la espermiación:



Existen dos gonadotrofinas secretadas por la *pars distalis* de los peces, GtH I y GtH II, las cuales son estructuralmente similares a la hormona folículoestimulante (FSH) y luteinizante (LH) de vertebrados tetrápodos respectivamente (Querat, 1994). La GtH I ha sido aislada y tiene un papel importante en la esteroidogénesis gonadal (Van Der Kraak y Wade, 1994; Breton y col, 1998), sin embargo hay poca información sobre el control neuroendocrino (Blázquez y col, 1998). En contraste existe una vasta información sobre GtH II la cual estimula la esteroidogénesis gonadal, gametogénesis y liberación de esperma y oocitos (Yaron, 1995). Se ha comprobado que GH también estimula la esteroidogénesis gonadal en varias especies (Le Gac y col., 1993).

Como se mencionara anteriormente, varias formas de GnRH y sus análogos juegan un papel fundamental en regular la función reproductiva a través de la liberación de GtH II. Esto fue originalmente demostrado en *Carassius auratus* (Marchant y col., 1989), en *Cyprinus carpio* (Lin y col., 1993) y en *Oreochromis* sp. (Melamed y col., 1995). En varias especies gonocóricas la maduración final y la puesta puede ser inducida con GnRH natural o análoga, aunque la última suele ser más efectiva.

Los esteroides sexuales modulan muchos aspectos del eje neuroendocrino. Estudios realizados en *Carassius auratus*, indican que la testosterona (T) a través de su aromatización a estradiol (E<sub>2</sub>) mejora la liberación de GtH II en la gónada intacta de machos y hembras, estimulados por GnRH. Este efecto de retroalimentación positiva de la T, está dirigido a nivel de la hipófisis donde ella mejora la liberación de GtH II por un mecanismo dependiente de síntesis de proteínas (Trudeau y col., 1991; 1993), sin embargo este mecanismo está pobremente entendido. En tilapia los esteroides sexuales tienen acciones de retroalimentación positiva y negativa sobre la expresión del ARN mensajero para GtH I. La retroalimentación negativa de los esteroides sexuales, al menos en *Carassius auratus* (Trudeau y col., 1993), *Oncorhynchus mykiss* (trucha arco iris) (Linard y col., 1995) y *Clarias gariepinus* (bagre africano) (Vermeulen, 1994) actúan predominantemente a través de la activación del sistema inhibitorio de la dopamina, inhibiendo la liberación de GtH II .

### **ANÁLOGOS DE HORMONAS LIBERADORAS DE GONADOTROFINAS Y ANTAGONISTAS DOPAMINÉRGICOS.**

Existen péptidos sintéticos los cuales son análogos de las hormonas liberadoras de gonadotrofinas naturales, las cuales son encontradas en el hipotálamo de todos los

vertebrados. Los análogos de GnRH son formas sintéticas muy potentes las cuales han sido desarrolladas por modificación de la secuencia natural de aminoácidos. El reemplazo del aminoácido 10, una glicina, por una etilamida le confiere una mayor potencia, tal como el reemplazo del aminoácido en posición 6, por un aminoácido D adecuado. Uno de los análogos de GnRH más populares para inducir liberación de gametas en acuicultura es el análogo de mGnRH (LHRH), sustituido con una D alanina en posición 6, conocido como (D-Ala, des-Gly10) LHRH etilamida. Este análogo ha sido utilizado para inducir ovulación y espermiación en muchas especies de peces de agua dulce, salobre y salada, de agua fría, templada y tropical en todo el mundo (Zohar, 1989).

Otros análogos de GnRH están disponibles en el mercado. Estos pueden estar sustituidos en posición 6 por D triptofano (DTrp) o D serina(Dser). Otro muy utilizado en acuicultura es el GnRH de salmón, sGnRH (DArg6, des Gly10) etilamida, el cual tiene una D arginina en posición 6 (Blázquez y col., 1998).

Las especies como la carpa y el bagre, donde la dopamina juega un papel importante en la inhibición de la liberación de gonadotropina (GtH II), requieren un tratamiento simultáneo con GnRH y un antagonista dopaminérgico. Los antagonistas de la dopamina han sido utilizados con éxito, junto con LHRH, para inducir ovulación. Entre los más comunes se encuentran: domperidona, metocloropramide, pimozide y sulpirida (ver esquema anterior). La domperidona es el antagonista de la dopamina más ampliamente utilizado debido a que no atraviesa la barrera hematoencefálica (Blázquez y col., 1998).

Todos los teleósteos que han sido investigados hasta ahora pueden ser inducidos exitosamente a ovular o espermiar con análogos de hormonas liberadoras de gonadotropinas, ya sea solos o conjuntamente con antagonistas de dopamina.

En *Abramis brama* (besugo), mGnRH sola no es efectiva en inducir la liberación de gametas, pero si lo hace cuando es inyectada junto con un antagonista de dopamina. Los machos con una dosis de 4 µg de mGnRH y 4 mg de metoclopramide/kg de peso, espermian a las 24-32 hs. Glubokov et al., 1991). En *Cuplea harengus pallasi*, una inyección de 200 µg de mGnRH/kg provocó la espermiación en 3 a 6 días. (Carosfeld y col., 1988).

También, dentro de este contexto, se han utilizado hipófisis homólogas y heterólogas, hormonas liberadoras de gonadotropinas naturales y análogos sintéticos así

como GCh (gonadotropina coriónica humana) pero no todos los teleósteos han respondido a éstos inductores (Zohar, 1989; Donaldson, 1996; Patiño, 1997).

El papel del hipotálamo en el control de la función gonadal en teleósteos hermafroditas, específicamente relacionado con la reversión del sexo, es mucho menos entendido. En *Thalassoma bifasciatum* (Bloch), pez protogínico, se demostró que las gonadotropinas proveen un disparador interno para la transformación de ovario en testículo (Koulish y Kramer, 1989 a, b). En la misma especie tres inyecciones de sGnRH-A (D-Arg<sub>6</sub>, Pro<sub>9</sub>, Net-) LHRH en combinación con domperidona inducen la reversión sexual. Hacia el fin de la cuarta semana de tratamiento el 72 % de las hembras originales mostraron signos de reversión. A las seis semanas, el 92% de las hembras tenían ovarios que habían sufrido transformación. Sin embargo ninguna de ellas progresó más allá de los estadios tempranos (Kramer y col., 1993).

## **MATERIALES y MÉTODOS**

### **PARTE III A)**

#### **CARACTERIZACIÓN DE LAS VARIANTES ENDÓGENAS DE GnRH:**

##### **1) OBTENCIÓN DE CEREBROS E HIPÓFISIS. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA EXTRACCIÓN DE LOS PÉPTIDOS.**

Se llevaron a cabo dos experimentos utilizando cerebros de anguilas adultas provenientes de la provincia de Corrientes, compradas a un proveedor local. El primero fue realizado con animales de otoño y el segundo con individuos de primavera. Cada muestra estuvo constituida por 50 ejemplares.

Los animales fueron anestesiados en solución acuosa de benzocaína (0,1 g/l) para su mejor manipulación. Se decapitaron y fueron extraídas la gónada y el cerebro conjuntamente con la hipófisis. A estos últimos se accedió por medio de un corte longitudinal en la masa muscular de la región dorsal de la cabeza. Las muestras fueron inmediatamente congeladas en hielo seco hasta su posterior almacenamiento en freezer a - 70°C.

En el caso de la hipófisis, se utilizaron las 100 glándulas obtenidas, en un solo ensayo a fin de que la concentración de GnRH presente fuera detectable.

Para la extracción de los péptidos, se utilizó una adaptación del método de Sherwood y col., 1984 y Somoza y col., 1994. Tanto los cerebros como las hipófisis, fueron procesados con homogeneizador tipo Ultraturax, en 10 ml. de acetona:HCl 1N (100:3, V/V). Por cada 2 g de tejido se utilizó un volumen mínimo de extracción de 10 ml. La extracción se llevó a cabo a 4°C durante 3 horas bajo agitación constante y se filtró con papel Whatman N° 1. El material insoluble fue reextraído con acetona:HCl 0,01N (80:20, V/V) en dos quintos del volumen del fluido original de extracción bajo agitación a 4 °C durante 5 min. y se lo filtró nuevamente. Los filtrados combinados fueron entonces extraídos con éter de petróleo (bp. 30-60°C) para remover la acetona, lípidos y otras sustancias hidrófobas. La relación de éter de petróleo con el filtrado fue de 1:4, (V/V) por cada una de las cinco extracciones realizadas sucesivamente. La fase acuosa final fue concentrada hasta un volumen de 1 ml. en un evaporador rotatorio mantenido a temperatura ambiente.

## **2) CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN, FASE REVERSA (RP-HPLC).**

Previamente a la separación cromatográfica, siguiendo el protocolo de Sherwood y col., 1986, cada extracto obtenido fue filtrado mediante filtro Millipore HA 0,45µm e inyectado a través de un loop de inyección de 1 ml. a una Columna RP18 Lichospher Merck 100 (4 x 250 mm; tamaño de partícula: 5 µm; Merck, de fase reversa) unida a una pre-columna del mismo material. El flujo fue programado para 1 ml/ min. y en cada corrida cromatográfica se recolectaron 70 fracciones.

El programa comenzó con 10 min. de corrida isocrática de solventes: -fase A-, acetonitrilo al 17% en TEAF (ácido fórmico 0,25 M llevado a pH 6,5 con trietilamina). Luego la concentración de acetonitrilo fue aumentada linealmente hasta un 24% en un período de 7 min. -fase B- y se continuó con este porcentaje hasta el final de la cromatografía.

La inyección de cada extracto fue precedida por una corrida blanco en la cual se inyectó fase móvil (1 ml). Estas fracciones también fueron analizadas para descartar cualquier contaminación. La posición de elución de los 5 estándares sintéticos utilizados (variantes moleculares sintéticas de GnRH: mGnRH, lGnRH-I, cGnRH-I, cGnRH-II y sGnRH como forma más hidrofóbica; adquiridos en Peninsula Laboratories Inc., San Carlos, CA, USA) se determinó por absorción U.V. a 280 nm. En cada caso se mezclaron 250 ng de estándar en fase A en 1 ml de volumen final. Todas las formas sintéticas fueron gentilmente cedidas por el Dr. G. Somoza, quien supervisó todos los experimentos.

## **3) RADIO INMUNO ANÁLISIS (RIA)**

Todas las fracciones colectadas (blanco, muestra y estándares) fueron evaporadas y liofilizadas. Para determinar la inmunoreactividad a GnRH (ir-GnRH), las fracciones fueron resuspendidas en buffer para radioinmunoensayo (PBS-BSA 0,5%, pH 7,5).

Como primer sistema de detección, se utilizaron tres antisueros poliespecíficos elevados contra distintas variantes moleculares de GnRH:

**cII#678:** generado en conejo contra cGnRH-II y utilizado en un sistema con mGnRH como standard y como molécula marcada, con las siguientes reactividades cruzadas contra variantes conocidas de GnRH:

mGnRH: 100%, cfGnRH: 36%, cGnRH-I: 416%, dfGnRH: 18%, cGnRH-II: 81%, lGnRH-I: 3%, sGnRH: 473%.

Este antisuero fue ggentilmente cedido por la Dra. J.A. King (Universidad de Ciudad del Cabo, RSA) al Dr. Gustavo Somoza.

**PBL#45:** generado en conejo contra Lys<sup>8</sup>-mGnRH y utilizado en un sistema con sGnRH como standard y como molécula marcada con las siguientes reactividades cruzadas contra variantes conocidas de GnRH:

mGnRH: 100%, cGnRH-I: 133.3%, cGnRH-II: 25.9%, lGnRH-I: 24%, sGnRH: 100%, dfGnRH: 1.58%.

Gentilmente cedido por el Dr. W. Vale, The Clayton Foundation, USA al Dr. Gustavo Somoza.

**PBL#49:** generado en conejo contra sGnRH y utilizado en un sistema homólogo con las siguientes reactividades cruzadas contra variantes conocidas de GnRH:

mGnRH: 93%, cGnRH-I: 333.3%, cGnRH-II: 32.6%, lGnRH-I: 2%, sGnRH: 100%, dfGnRH: 4,59%.

Idem anterior.

**Tabla 1:** porcentaje comparativo de reactividades cruzadas de los antisueros utilizados con las variantes sintéticas conocidas de GnRH.

| <b>Variante de GnRH</b>                      | <b>CII#678</b> | <b>PBL#45</b> | <b>PBL#49</b> |
|----------------------------------------------|----------------|---------------|---------------|
| <b>Dilución final</b>                        | 1:32.000       | 1:150.000     | 1:250.000     |
| <b>Dosis mínima detectable</b>               | 3.65 pg/100µl  | 2.36 pg/100µl | 1.49 pg/100µl |
| <b>GnRH-I<sup>125</sup> (radio-iodinado)</b> | mGnRH          | sGnRH         | sGnRH         |
| <b>GnRH estándar</b>                         | mGnRH          | sGnRH         | sGnRH         |

|                 |      |        |        |
|-----------------|------|--------|--------|
| <b>mGnRH</b>    | 100% | 100%   | 93%    |
| <b>cGnRH-I</b>  | 416% | 133.3% | 333.3% |
| <b>cGnRH-II</b> | 81%  | 25.9%  | 32.6%  |
| <b>sGnRH</b>    | 473% | 100%   | 100%   |
| <b>lGnRH-I</b>  | 3%   | 24%    | 2%     |
| <b>dfGnRH</b>   | 18%  | 1.58%  | 4.59%  |
| <b>cfGnRH</b>   | 36%  | nd     | nd     |

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

Como segundo sistema de detección de mayor especificidad, se utilizaron tres antisueros monoespecíficos. Se realizaron análisis por diluciones sucesivas de las fracciones con inmunoreactividad.

**cII#675** (concentración final 1:160.000).

Reactividad cruzada: mGnRH (<0.01%), cGnRH-I (<0.01%), cGnRH-II (100%), sGnRH (3%), lGnRH-I (<0.01%).

Gentilmente cedido por la Dra. J.A. King al Dr. Gustavo Somoza.

**s#1668** (concentración final 1:10.000).

Reactividad cruzada: mGnRH (<0.01%), cGnRH-I (<0.01%), cGnRH-II (0.7%), sGnRH (100%), lGnRH-I (0.2%).

Idem anterior.

**sGnRH#2** (concentración final 1:300.000).

Reactividad cruzada: mGnRH (<0.01%), cGnRH-I (<0.01%), cGnRH-II (1.58%), sGnRH (100%), lGnRH-I (<0.08%).

Gentilmente cedido por el Dr. K. Aida (University of Tokio, Japón) al Dr. Gustavo Somoza.

**Tabla 2:** porcentaje comparativo de reactividades cruzadas de los antisueros monoespecíficos utilizados, con las variantes de GnRH conocidas.

| <b>Variante de GnRH</b> | <b>cII#675<br/>(dil. final 1:160000)</b> | <b>s#1668<br/>(dil. final 1:10000)</b> | <b>sGnRH#2<br/>(dil. final 1:300000)</b> |
|-------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------|
| <b>mGnRH</b>            | < 0.01%                                  | < 0.01%                                | < 0.01%                                  |
| <b>cGnRH-I</b>          | < 0.01%                                  | < 0.01%                                | < 0.01%                                  |
| <b>cGnRH-II</b>         | 100%                                     | 0.7%                                   | 1.58%                                    |
| <b>sGnRH</b>            | 3%                                       | 100%                                   | 100%                                     |
| <b>lGnRH-I</b>          | < 0.01%                                  | 0.4%                                   | < 0.08%                                  |
| <b>dfGnRH</b>           | nd                                       | nd                                     | 398                                      |

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

Para evaluar el grado de desplazamiento de las curvas ensayadas respecto de las obtenidas con las hormonas estándar se utilizó un test de ANOVA, modificado por el Dr. Enrique Marschoff del Lab. de Biometría de la FCEyN (U.B.A)

En el homogenato obtenido de 100 hipófisis, se realizó también la inmunodetección con antisueros poliespecíficos en los mismos sistemas heterólogos a fin de determinar qué variantes se encontraban presentes en esta especie.

Todos los experimentos fueron llevados a cabo en forma conjunta con el Lic. Mario Ravaglia, del Laboratorio de Embriología Animal, FCEyN, UBA; quien desarrolló el mismo protocolo de trabajo con grupos de hembras.

## **PARTE IIIB)**

### **INDUCCIÓN DE LA ESPERMIACIÓN**

#### **1) OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO PREVIO DE LOS ANIMALES**

Se utilizaron ejemplares adultos, provenientes de la provincia de Corrientes, comprados a un proveedor local.

Los animales, una vez en el laboratorio, fueron inducidos a sedación para su mejor manipulación con una solución acuosa de benzocaina (0,1 g/l) a fin de medir todos los caracteres morfométricos definidos (capítulo I, ítem 3). Los peces de los experimentos, denominados **I** y **II**, no fueron sexados por el método de biopsia (ver detalle de la técnica más adelante), pero si lo fueron aquellos de los experimentos **III** y **IV**. En este último caso, el material extraído por biopsia fue procesado histológicamente.

Los peces de los experimentos **I** y **II** fueron separados en lotes de 12 individuos en base a la semejanza de la talla y el peso. Los individuos para los experimentos **III** y **IV**, fueron biopsados previamente y fueron agrupados teniendo en cuenta el sexo, estado de madurez de la gónada, y por peso y talla semejantes. Bajo el efecto de la sedación, cada animal fue identificado con caravanas plásticas numeradas, unidas mediante hilo de nylon a la región dorsocaudal del cuerpo.

Cada lote fue ubicado en un caja plástica de 50 lt. de capacidad, conteniendo agua de clorada, la cual fue renovada cada 2 días. Los animales fueron mantenidos a temperatura ambiente y con fotoperíodo natural.

Previamente al inicio de los experimentos de inducción, los animales biopsados fueron dejados en observación durante una semana, a fin de ver su evolución. Tanto en este periodo como durante los diferentes experimentos, todos los animales, bajo sedación, fueron alimentados con una papilla de carne de pescado e hígado vacuno utilizando una sonda buco gástrica plástica que era introducida hasta el estómago, tomando como referencia la mitad del largo del animal.

#### **2) MONITOREO DE LA ESPERMIACIÓN BASAL ESPONTÁNEA (PREVIO AL EXPERIMENTO)**

Posteriormente a inducir sedación y medir todos los caracteres, se colocó a cada animal en posición ventral y por medio de masaje abdominal en sentido antero -

posterior (stripping), se registró la emisión espontánea de gametas. Este monitoreo se realizó diariamente durante cada experimento.

### **3) BIOPSIAS**

Esta metodología permitió conocer el sexo y el estado de madurez de la gónada del ejemplar, dado que externamente es imposible distinguirlos. De este modo se pudo realizar la técnica de inducción, con la certeza que se estaba trabajando con machos, y conociendo previamente el estado de madurez de las gónadas.

Tres meses antes de comenzar con los protocolos de inducción del segundo período (experimentos III y IV), y para poner a punto la técnica, se utilizaron 8 ejemplares de diversas tallas. Dado el tipo de animal a tratar, se utilizaron protocolos conocidos (Chan, 1972; Underwood, 1986), con algunas modificaciones:

Los ejemplares fueron anestesiados con solución acuosa de benzocaina (0,1 g/l), pesados y medidos como se detalló anteriormente. (Cap. I, ítem 3).

Se colocó al animal decúbito dorsal y aproximadamente a media distancia entre el ano y el opérculo, se inyectaron intramuscularmente 0,25 ml de clorhidrato de procaína (Fadacaina) como anestésico local parenteral.

Se realizó una incisión longitudinal en un punto medio entre el ano y el opérculo de 2 a 3 cm, con bisturí y se colocó un separador dinámico. El hígado y el intestino fueron suavemente desplazados hasta dejar expuesta la porción cefálica de la gónada.

Se procedió a la intervención de la gónada, la cual fue sujeta con pinzas y ligada con hilo de sutura sintético por debajo de la zona de corte, a 1,5 cm de su extremo anterior para evitar pérdida de fluidos. Previo a la sutura, se colocó en la cavidad abdominal sulfa peritoneal para evitar infecciones.

Se suturaron en forma perforante y con puntos separados los planos musculares y la piel. Para ello se usó aguja curva e hilo sintético no-reabsorbible. Luego de la sutura, se recubrieron los puntos con Povidona Iodo 10% como antiséptico, bactericida y fungicida. Finalmente se selló la zona con pegamento instantáneo de tipo Cianocrilato.

Los animales intervenidos fueron identificados con caravanas plásticas unidas por hilo de nylon a la aleta dorsal.

Para su recuperación, se los colocó en recipientes con agua declorada y azul de metileno (0,1%) como agente profiláctico. Durante 96 horas se los mantuvo en ayunas

para controlar su evolución. Pasado este período los animales fueron llevados a piletas acondicionadas convenientemente como se indicara anteriormente a fin de reproducir su hábitat natural, donde fueron alimentados periódicamente. Las muestras de gónadas obtenidas fueron fijadas, conservadas y procesadas para su estudio histológico de acuerdo con la metodología descripta previamente (Cap. I).

#### **4) DISEÑO EXPERIMENTAL**

##### **\*\* EXPERIMENTO I (enero)**

*Biopsias para sexado previo:* no

*Duración total:* 18 días

*N por caja:* 12 animales elegidos por peso y talla homogénea

*Diseño de lotes:*

**lote 1: grupo control:** sol. salina / sol. salina

**lote 2: grupo domperidona:** sol. salina / domperidona.

**lote 3: grupo GnRH:** sol. salina / sGnRH-a.

**lote 4: grupo GnRH/domperidona:** sGnRH-a / domperidona.

*Dosis ensayadas:* las drogas fueron previamente disueltas y suspendidas en solución salina para peces (NaCl al 0.7%, P/V) e inyectadas intramuscularmente en las siguientes concentraciones:

- 2 µl de sol. salina / g de peso del animal.

- 0.05 µg sGnRH-a/ g de peso del animal (en 2 µl/g de solución salina como vehículo).

- 5 µg DOM/g de peso del animal (en 2 µl/g de solución salina como vehículo).

**GnRH utilizado:** sGnRH-A (análogo) ([D-Arg<sup>6</sup>,Trp<sup>7</sup>,Leu<sup>8</sup>,Des Gly<sup>10</sup>]GnRH-Ethylamide, Península Laboratories Inc.).

**Domperidona:** Janssen Pharmaceutical, Buenos Aires, Argentina. Vida media en sangre: 36 a 48 hs.

*Calendario del tratamiento:*

Tanto el grupo control como el tratado recibieron una única inyección intramuscular el **día 0** del experimento.

### **Extracción de sangre y obtención de sueros para dosaje de esteroides**

Las muestras de sangre de aproximadamente 1 ml por animal, se extrajeron por punción post-anal de la vena caudal utilizando jeringas de tuberculina. La misma se mantuvo a 4°C hasta la retracción del coágulo (toda la noche) y se extrajo el suero por centrifugación a 3000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C. Con pipeta Pasteur plástica se trasvaso el suero a tubos Khan y se almacenó a -20°C hasta su utilización para el dosaje de niveles de 17 $\beta$ -estradiol y andrógenos circulantes por RIA. según trabajos previos en el tema (Sangalang & Freeman, 1977; Guiguen y col. 1993; Trudeau y col. 1991, 1993; Venkatesh y col. 1989).

*Calendario de extracción de sangre: basal* (día 0, antes de cualquier inyección), a las 24 hs del tratamiento y a los 3, 6, 10, 16 y 18 días.

*Calendario de sacrificio:* posteriormente a la extracción de la muestra de sangre, y para correlacionar los posibles cambios en el perfil de esteroides con la histología gonadal, se sacrificaron 2 animales por vez los mismos días de extracción de sangre como se indicara anteriormente.

### **\*\* EXPERIMENTO II (enero-febrero)**

*Biopsias para sexado previo:* no

*Duración total:* 16 días

*N por caja:* 12 animales elegidos por peso y talla homogénea

*Diseño de lotes:*

**lote 1: grupo control:** sol. salina/sol. salina.

**lote 2: grupo domperidona:** sol. salina/domperidona.

**lote 3: grupo GnRH:** sol. salina/sGnRH-a.

**lote 4: grupo GnRH/domperidona:** sGnRH-a/domperidona.

*Dosis ensayadas:*

- 2 $\mu$ l de sol. salina como vehículo/g de peso del animal

- 0.05  $\mu$ g sGnRH-a/g de peso del animal

- 5 $\mu$ g DOM/ g de peso del animal

*Calendario del tratamiento:*

El grupo control recibió una inyección intramuscular de solución salina 0,7% (2µl/g de peso del animal) los días 0 y 7 del experimento.

Los grupos tratados recibieron una inyección intramuscular los días 0 y 7 del experimento.

*Calendario de extracción de sangre: basal, a las 24 hs del tratamiento y a los 3, 6, 10 y 16 días.*

*Calendario de sacrificio: se sacrificaron 2 animales por vez los mismos días de extracción de sangre como se indicara anteriormente.*

**\*\* EXPERIMENTO III (enero-febrero)**

Durante los períodos de enero-febrero, febrero-marzo del año siguiente, se realizó nuevamente el protocolo antes mencionado con una serie de modificaciones en base a los resultados obtenidos el año anterior.

Los experimentos se realizaron con machos primarios y secundarios utilizando como criterio de selección que poseyeran un diámetro gonadal de 0,5 a 0,7 mm, que corresponde a un estadio de maduración media (Lo Nostro y Guerrero, 1996).

Si bien se realizó la biopsia a un total de 50 animales, las limitaciones en las gónadas halladas, redujeron el ensayo a 2 lotes de 8 animales.

*Biopsias para sexado previo: si*

*Duración total: 22 días*

*N por caja: 8*

*Diseño de lotes:*

**lote 1: grupo control: sol. salina/sol. salina.**

**lote 2: grupo GnRH/domperidona: sGnRH-a/domperidona.**

*Dosis ensayadas:*

- 2µl de sol. salina /g de peso del animal

- 0.1 µg sGnRH-a (dosis duplicada)/g de peso del animal

- 5µg DOM/g de peso del animal

*Calendario del tratamiento:*

Todos los grupos recibieron una inyección intramuscular según dosis, los días 1, 7 y 14 del ensayo.

*Calendario de extracción de sangre:* basal (día 0), los días 1 y 3 de cada semana y el día 22.

*Sacrificio:* al final del experimento

La gónada de cada animal sacrificado tanto tratado como control, fue procesada utilizando técnicas histológicas convencionales según se indica en detalle en el cap. I. con el objeto de estudiar el estado de maduración gonadal. Los preparados fueron analizados y fotografiados con un microscopio óptico Nikon Microphot FX.

**\*\* EXPERIMENTO IV (febrero-marzo)**

*Biopsias para sexado previo:* si

*Duración total:* 49 días (7 semanas)

*N por caja:* 5 para el lote control y 8 para el tratado

*Diseño de lotes:*

**lote 1: grupo control:** sol. salina/sol. salina.

**lote 2: grupo tratado:** sGnRH-a/domperidona.

*Dosis ensayadas:*

- 2µl de sol. salina como vehículo/g de peso del animal

- 0.1 µg sGnRH-a/g de peso del animal

- 5µg/g DOM/g de peso del animal

*Calendario del tratamiento:*

Los lotes fueron inyectados los días 1 y 4 de cada semana.

*Calendario de extracción de sangre:* basal (día 0) y días 21 y 49 (corresponde al último día de la 3ª y 7ª semana).

*Sacrificio:* al final del experimento (idem Exp. III).

## **5) DOSAJE DE ESTEROIDES SEXUALES CIRCULANTES POR EL MÉTODO DE RIA.**

Cada muestra de sangre tomada el día 0 (muestra basal) y los días indicados según cada protocolo, fueron colocadas inmediatamente en hielo y luego en heladera a 4°C toda la noche hasta retracción del coágulo. Como se indicara previamente, luego de la centrifugación el suero se almacenó a -20°C hasta la determinación de los esteroides por RIA, según Venkatesh y col., 1989, con algunas modificaciones: la extracción de esteroides se realizó dos veces con 5 volúmenes de éter dietílico. La fase orgánica así obtenida fue evaporada en baño termostático a 37°C, y con atmósfera de nitrógeno.

Las muestras secas fueron resuspendidas en buffer fosfato con gelatina 0,1% (PBS-gel), a razón de 2 volúmenes de éste, por volumen de la muestra original, y conservadas a -20°C hasta su utilización.

La puesta a punto de la técnica de radioinmunoensayo para 17 $\beta$ -estradiol y testosterona se realizó según Van der Kraak y col., 1984.

Los antisueros utilizados, anti-estradiol y anti-testosterona, fueron adquiridos al Dr. Gordon Niswender (Animal Reprod. and Biotech. Lab., Dept. of Physiology, Colorado State Univ., USA) y utilizados en dilución final de 1:120.000 y 1:250.000 respectivamente.

Ensayos previos a estos experimentos, demostraron que el antisuero anti-testosterona, presentaba una reacción cruzada de aproximadamente 37% contra 11 cetotestosterona (11-KT). Teniendo en cuenta esta reactividad cruzada, y la imposibilidad de diferenciarla de la testosterona presente sin previa separación cromatográfica, los valores de hormona medidos se expresan como "niveles de andrógenos" circulantes.

Por otro lado se realizó un ensayo de paralelismo de las curvas, haciendo diluciones sucesivas del suero extraído y comparándolo con una curva estándar de testosterona..

Los niveles séricos de andrógenos fueron analizados utilizando un test de Student, comparando los niveles de esteroides sexuales obtenidos en el grupo control vs. El grupo tratado. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ .

Todos los experimentos fueron llevados a cabo en forma conjunta con el Lic. Mario Ravaglia, del Laboratorio de Embriología Animal, FCEyN, UBA; quien desarrolló el mismo protocolo de trabajo con grupos de hembras.

## RESULTADOS

### VARIANTES DE GnRH PRESENTES EN EL CEREBRO

Las fracciones obtenidas de cerebro utilizando RP-HPLC, mostraron la presencia de dos picos principales inmunoreactivos, coincidentes con la posición de elución de las formas sintéticas cGnRH-II (fracciones #25-#27) y sGnRH (fracción #46-48) (Figura 41). La coincidencia de estas determinaciones realizadas con 3 sistemas de RIA distintos y la posición de elución de los estándares sintéticos permitiría suponer la expresión de estas dos variantes en el cerebro de *S. marmoratus*.

Se realizaron ensayos de RIA específicos para los dos picos principales detectados: cIIIGnRH y sGnRH. Las pruebas de inmunodetección llevadas a cabo mediante la dilución de las fracciones en estudio y de estándares conocidos utilizando los antisueros monoespecíficos correspondientes, reforzó los resultados obtenidos y mostrados en la figura 41. El paralelismo de las curvas obtenidas por la dilución de estas muestras no fue estadísticamente diferente al obtenido con los estándares sintéticos (Figura 42).

Por otro lado, con este mismo sistema se detectaron dos picos inmunoreactivos a GnRH de menor magnitud, en las fracciones 29 y 31 que no eluyeron en la posición de ninguna de las variantes sintéticas de GnRH ensayadas (cfGnRH, IGnRH-I, mGnRH, cGnRH-I, cGnRH-II y sGnRH). Estos picos fueron inmunodetectados usando los tres sistemas de RIA, pero no tuvo reacción cruzada con el sistema ensayado con cII675, ni con los dos sistemas específicos utilizados para sGnRH.

Los resultados obtenidos fueron semejantes en ambos experimentos, no habiendo diferencias significativas entre los mismos.

El análisis de los extractos de hipófisis con los mismos sistemas no presentó ningún tipo de inmunodetección de GnRH con el sistema ensayado.

### INDUCCIÓN DE LA ESPERMIACIÓN

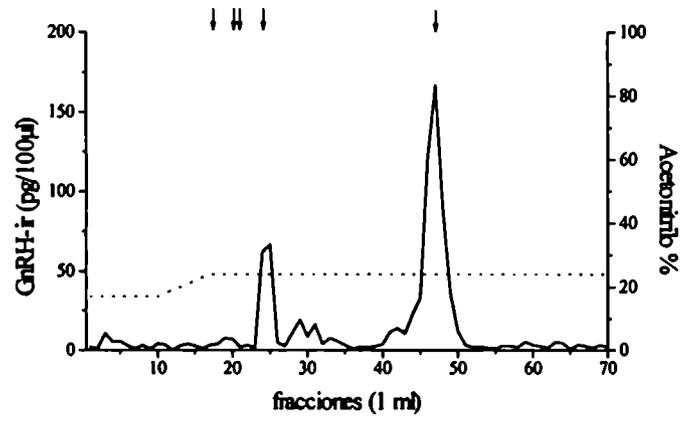
Durante los meses de verano, se realizaron una serie de experimentos tendientes a lograr la inducción de la maduración final y liberación de gametas mediante la utilización de sGnRH-a y domperidona.

El propósito de los experimentos I y II, fue poner a punto el sistema de mantenimiento de ejemplares en cautiverio, dado que no existían antecedentes de

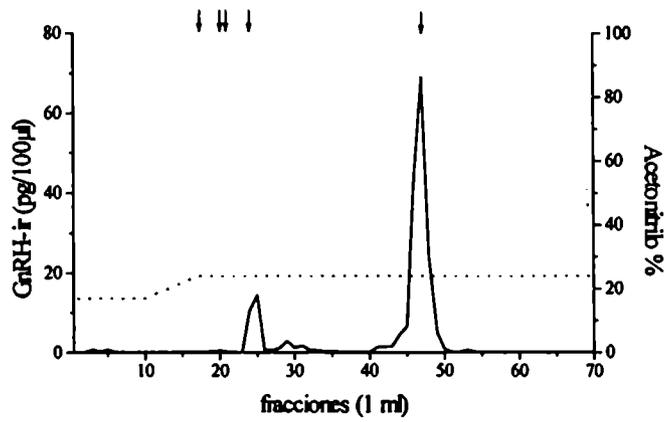
**Figura 41.**

RP-HPLC de extractos de cerebro de *S. marmoratus* ensayados con: a) antisuero cII678, b) antisuero PBL#49, c) antisuero PBL#45. Las flechas indican la posición de elución, de izquierda a derecha: cfGnRH, mGnRH y lGnRH-I, cGnRH-I, cGnRH-II y finalmente sGnRH.

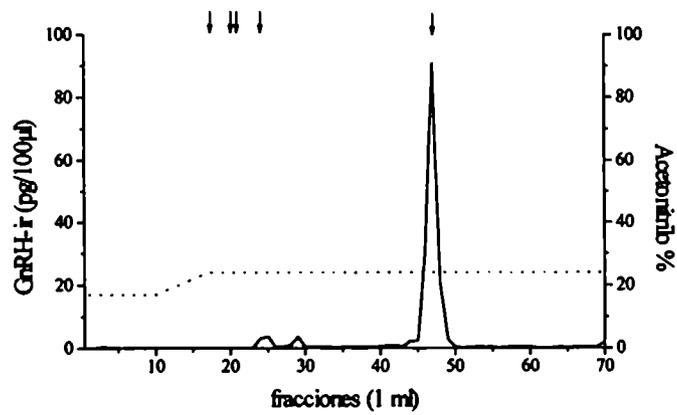
**a) cII678**



**b) PBL#49**



**c) PBL#45**



**Figure 42.**

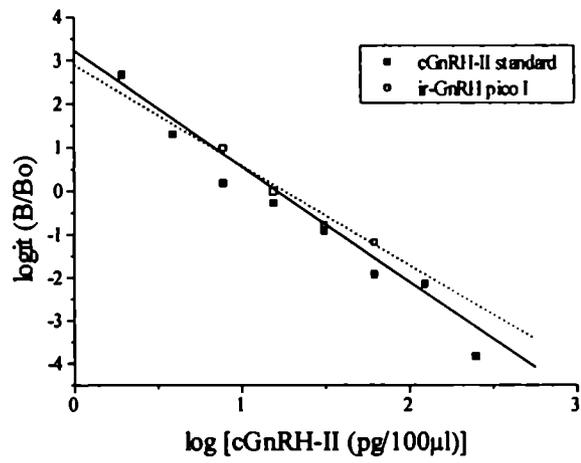
a) Paralelismo de diluciones seriadas de las fracciones 24-25 obtenidas por RP-HPLC de extractos de cerebro con referencia a la forma de la curva de cII GnRH sintética usando cII675 como antisuero.

b) Paralelismo de diluciones seriadas de las fracciones 45-49 obtenidas por RP-HPLC de extractos de cerebro con referencia a la forma de la curva de sGnRH sintética usando s1668 como antisuero.

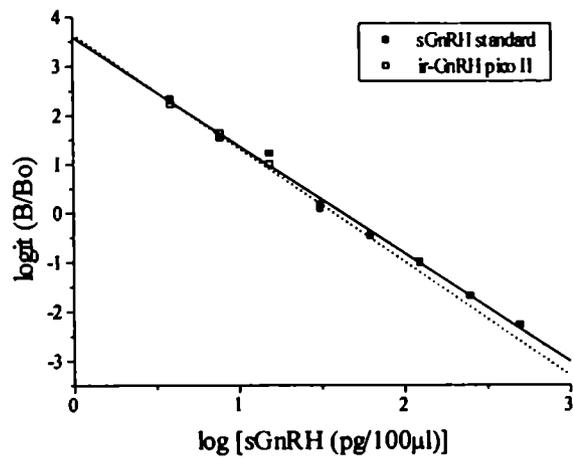
c) Paralelismo de diluciones seriadas de las fracciones 45-49 obtenidas por RP-HPLC de extractos de cerebro con referencia a la forma de la curva de sGnRH sintética usando sGnRH como antisuero.

El grado de paralelismo entre las muestras y los estándares sintéticos no mostró diferencias significativas.

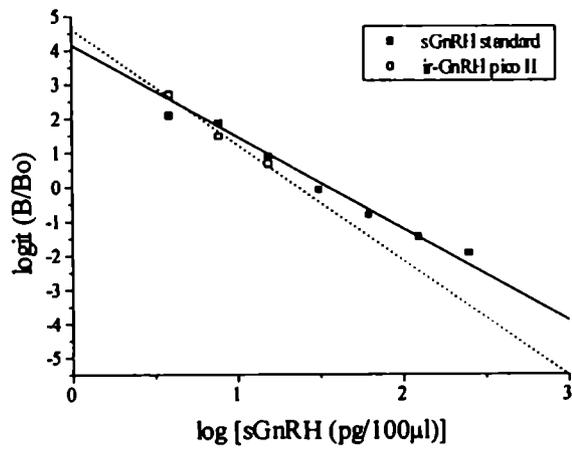
**a) cIIIGnRH y antisuero cII678**



**b) sGnRH y antisuero s1668**



**c) sGnRH y antisuero sGnRH#2**



ensayos en cautiverio esta especie, extracción de muestras de sangre, y administración y respuesta a las drogas ensayadas.

El experimento I, no indujo la liberación de gametas, en ninguna de las pruebas realizadas. Durante el experimento II, a las 144 hs postinyección (día 6), se produjo la liberación de gametas en un sólo un macho del lote GnRH/DOM, por masaje abdominal.

Es de remarcar que la mortandad durante estos experimentos fue elevada y la respuesta a la inducción fue baja. En base a estos primeros resultados y a la bibliografía específica consultada, (Kreiberg y col., 1987; Milonas y col., 1992; Tao y col., 1993; Lee y col., 1993; Kramer y col., 1993;) se programaron dos nuevos experimentos (III y IV) para el verano siguiente.

Las modificaciones introducidas fueron: no sacrificar más animales durante el tratamiento sino al final del mismo, y aumentar, no sólo la dosis diaria sino el número de inyecciones. La utilización de la técnica de biopsia permitió obtener muestras de gónadas de animales en cautiverio para conocer previamente el sexo, y el estado de madurez de la misma. Es importante destacar que se observó tanto en los animales del lote de puesta a punto de la técnica, como en estos dos experimentos posteriores, una excelente cicatrización externa en cada ejemplar intervenido, e internamente la gónada remanente no presentó alteraciones morfo-anatómicas visibles (Figura 43).

Los tratamientos realizados en el experimento III, condujeron a la espermiación de 2 machos del lote GnRH/DOM durante la tercera semana (17 días).

En el experimento IV, en el lote GnRH/DOM, se obtuvo a los 17 días de tratamiento un 50% de machos espermiantes, a la 4ta. semana (día 29) un 70% y a la 5ta. semana del tratamiento (día 38), se produjo la liberación de semen en el 100% de los machos tratados. No se obtuvo liberación de gametas en el lote control durante las 7 semanas (Tabla 1).

El semen obtenido por masaje abdominal durante el experimento IV fue colectado en un tubo de tipo Eppendorf como se indicara en materiales y métodos del Cap. 2 y utilizado para M.E.S. Los resultados obtenidos se indicaron en el mismo capítulo.

**Figura 43.**

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.

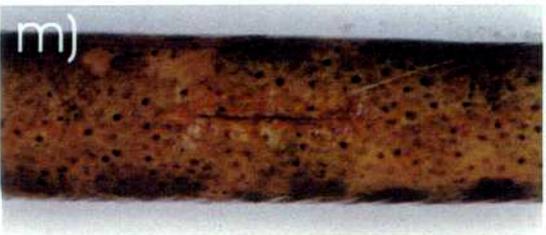
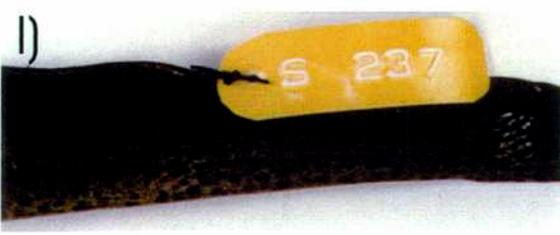
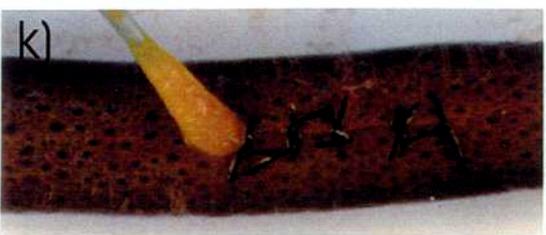
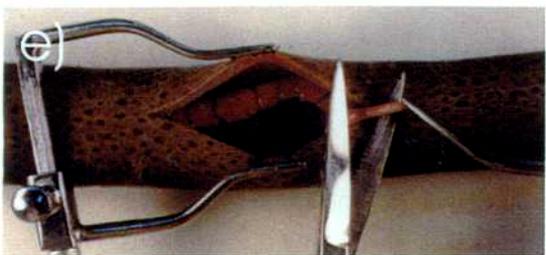
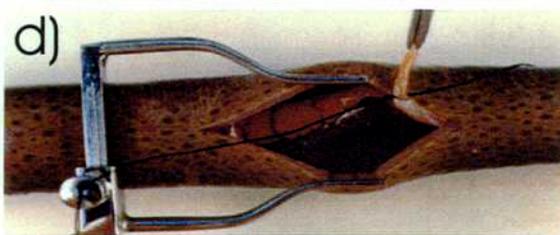
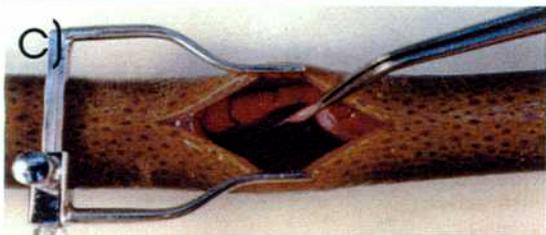
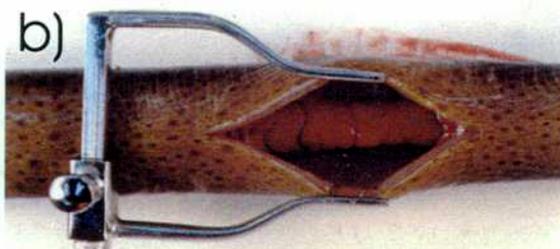


Tabla 1. Porcentaje de machos espermiantes durante los 49 días de tratamiento (Exp. IV).

| <b>Días de tratamiento</b> | <b>Lote Tratado GnRH/DOM<br/>(n=8)</b> | <b>Lote Control<br/>(n=5)</b> |
|----------------------------|----------------------------------------|-------------------------------|
| 0                          | 0                                      | 0                             |
| 3                          | 0                                      | 0                             |
| 7                          | 10                                     | 0                             |
| 10                         | 10                                     | 0                             |
| 14                         | 12.5                                   | 0                             |
| 17                         | 50                                     | 0                             |
| 21                         | 50                                     | 0                             |
| 24                         | 50                                     | 0                             |
| 28                         | 87.5                                   | 0                             |
| 31                         | 87.5                                   | 0                             |
| 35                         | 87.5                                   | 0                             |
| 38                         | 100                                    | 0                             |
| 42                         | 100                                    | 0                             |
| 49                         | 100                                    | 0                             |

## **ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LAS GÓNADAS.**

### Experimentos I y II:

No se observaron diferencias significativas a nivel histológico entre las gónadas tratadas con sGnRH/DOM, sGnRH solo o DOM solo y el control. El único macho espermiante presentó un testículo con el aspecto característico de la clase maduración final.

### Experimentos III y IV

En ambos experimentos se observaron diferencias histológicas importantes a nivel de la gónada entre los animales tratados y los controles tanto para machos primarios como secundarios.

El análisis histológico de las gónadas de los machos del grupo control al final de cada experimento, mostró la presencia lóbulos espermáticos conteniendo espermatocistos con diferentes estadios de la espermatogénesis. Las gónadas se encontraban en clase maduración media (Figura 44a, experimento IV).

En el experimento III, los machos tratados que no espermiaron, presentaron testículos característicos de la clase maduración media o final.

Por otro lado las gónadas de ambos tipos de machos, pertenecientes al lote tratado con GnRH/DOM (al final del experimento), en los experimentos III y IV, mostraron la presencia de lóbulos espermáticos con SPG, algunos SPC I y II y SPZ residuales en la luz de los lóbulos así como en los conductos eferentes, como una fuerte evidencia de haber finalizado la espermiación (Figura 44b,c, experimento IV). El aspecto de estos testículos se corresponde con el de la clase en regresión.

### **DOSAJE DE ESTEROIDES SEXUALES**

Para verificar el efecto inductor de las drogas usadas (GnRH y DOM.), se midieron con RIA estradiol (E) y testosterona (T) presentes en sangre, como una forma indirecta de evaluar la liberación de gonadotrofinas hipofisarias, ya que no se disponía de un sistema directo de medición de estas hormonas. La curva realizada con diluciones sucesivas del extracto de suero fue paralela a la curva estándar de T.

En el caso de los experimentos I y II, los niveles de E<sub>2</sub> y de andrógenos circulantes medidos fueron muy heterogéneos, presentando errores estándar muy elevados (datos no mostrados). Aun así, no se enmascaró el hecho que en el grupo tratado con sGnRH-a/DOM., se pudieran observar a las 24hs de la administración de las drogas, niveles de andrógenos varias veces superiores a los de los otros tratamientos (GnRH sólo o DOM sólo).

Se tomaron en cuenta los valores de andrógenos del experimento IV dado que eran los más significativos en cuanto a porcentaje de machos que espermiaron. Todos los valores fueron significativamente mayores a los del grupo control. Luego de 24 y 42 días de tratamiento, los niveles séricos de andrógenos fueron aproximadamente 23 y 28 veces más altos que los valores de los controles respectivamente ( $p < 0.01$ ) (Tabla 2 a y b y Figura 45).

Sólo en 3 machos tratados del experimento 4 y durante la séptima semana del protocolo de inducción, se lograron medir niveles de estradiol y fueron muy heterogéneos entre si (datos no mostrados). En el resto de los casos, no se detectaron

**Figura 44.**

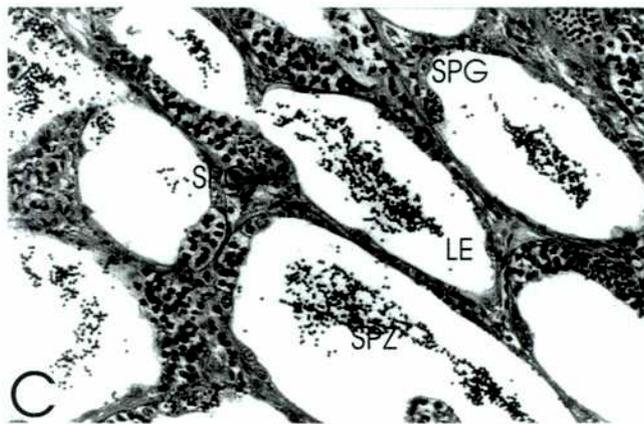
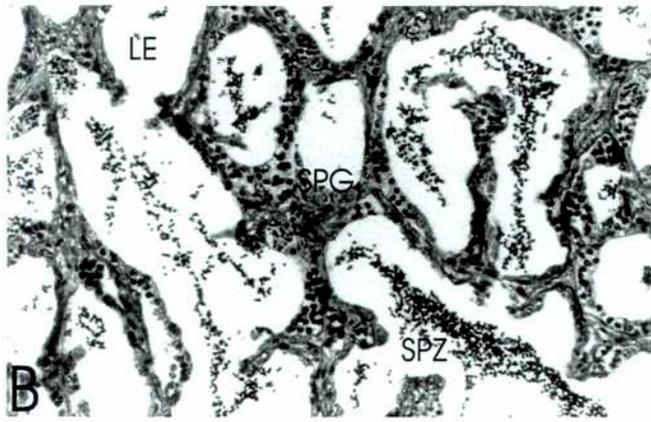
Detalle histológico de las gónadas de animales utilizados en la experiencia de inducción de la espermiación.

**A)** Corte histológico de la gónada de un macho primario del grupo control mostrando diferentes estadios de la espermatogénesis. 200x.

**B)** Corte histológico de un macho primario del grupo tratado con GnRH y domperidona. Presenta espermatogonias y espermatozoides residuales dentro de la luz lobular. 200x.

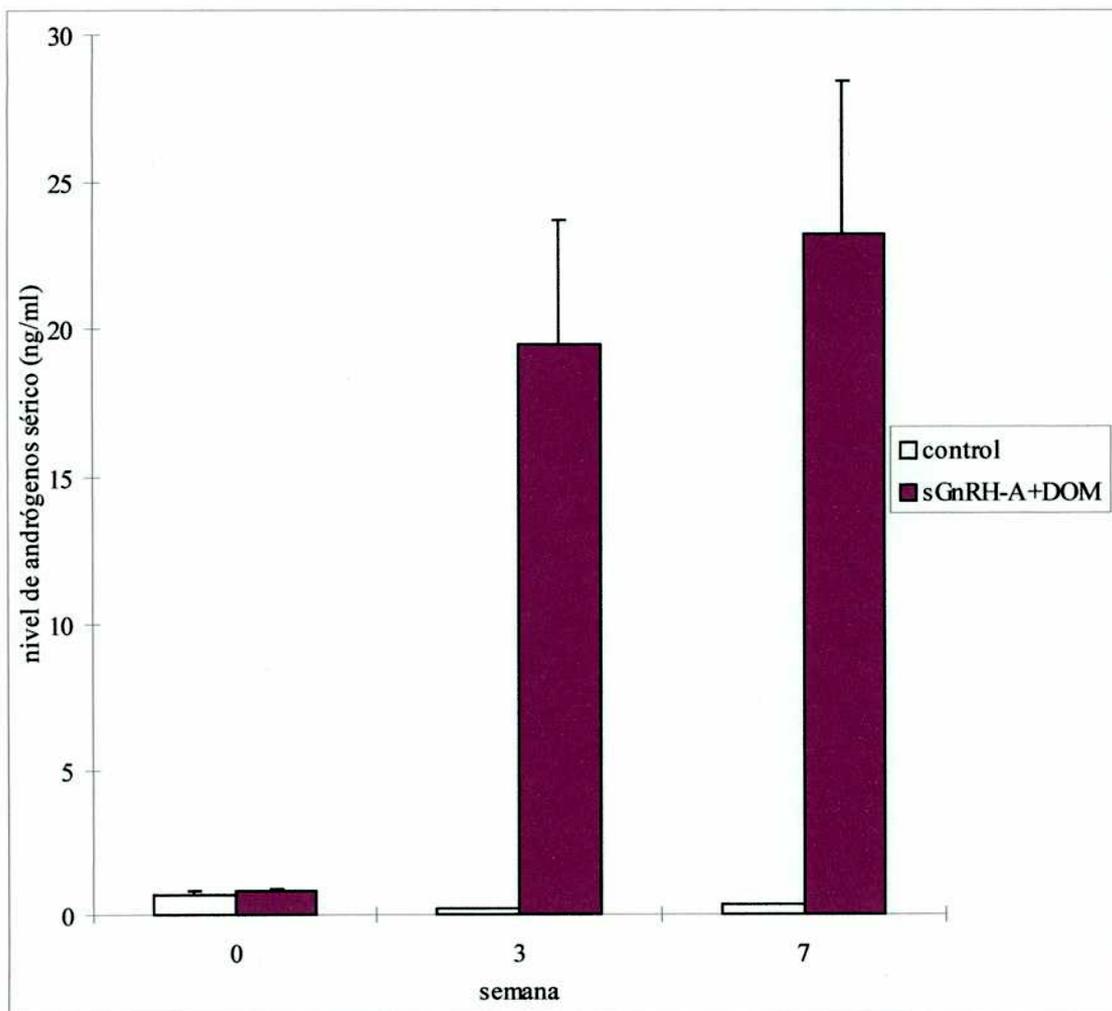
**C)** Corte histológico de un macho secundario del grupo tratado con GnRH y domperidona. Presenta espermatogonias y espermatozoides residuales dentro de la luz lobular. 200x.

LT: lóbulo testicular; SPG: espermatogonias; SPZ: espermatozoides.



**Figura 45.**

Niveles de andrógenos (ng/ml) en el grupo de machos al principio del experimento, y luego de 3 y 7 semanas de tratamiento respectivamente. Las barras representan la media +/- error estándar (grupo control N: 5; grupo tratado N: 8). \*\*  $p < 0.01$  comparado con los valores del control.



niveles de E<sub>2</sub> con el sistema utilizado. La dosis mínima detectable de estradiol es de aproximadamente 20 pg/ml, y la de andrógenos 15 pg/ml.

**Tabla 2. Niveles de andrógenos dosados en sangre en el experimento IV.**

**a) GRUPO CONTROL (sol. salina). N: 5 animales (1 a 5)**

| BASAL                           | DIA 24                           | DIA 42                          |
|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| 1) 0,555                        | 0,225                            | 0,286                           |
| 2) 1,253                        | 0,334                            | 0,443                           |
| 3) 0,431                        | 0,158                            | 0,264                           |
| 4) 0,457                        | 0,160                            | 0,349                           |
| 5) 0,632                        | 0,164                            | 0,376                           |
| <b>0,666</b><br><b>+/- 0,15</b> | <b>0,208</b><br><b>+/- 0,033</b> | <b>0,343</b><br><b>+/- 0,03</b> |

NOTA: Cada fila corresponde a un animal ensayado. La última fila (gris) corresponde al promedio ± el error estándar. Todos los valores están expresados en ng/ml

**b) GRUPO TRATADO (GnRH + domperidona). N: 8 animales (1 a 8)**

| BASAL                           | DIA 24                           | DIA 42                           |
|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 1) 0,839                        | 5,526                            | 8,560                            |
| 2) 0,806                        | 10,032                           | 18,556                           |
| 3) 1,253                        | 28,106                           | 33,260                           |
| 4) 1,055                        | 12,822                           | 21,580                           |
| 5) 0,800                        | 30,800                           | 28,900                           |
| 6) 0,762                        | 32,300                           | ***                              |
| 7) 0,396                        | 30,800                           | 45,360                           |
| 8) 0,0,649                      | 5,340                            | 6,646                            |
| <b>0,820</b><br><b>+/- 0,09</b> | <b>19,465</b><br><b>+/- 4,27</b> | <b>23,266</b><br><b>+/- 5,20</b> |

NOTA: Cada fila corresponde a un animal ensayado. La última fila (gris) corresponde al promedio ± el error estándar. Todos los valores están expresados en ng/ml. \*\*\* dato faltante.

## CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos al analizar los extractos de cerebro, utilizando una combinación de RP-HPLC y RIA, sugieren que *S. marmoratus* tiene al menos dos variantes diferentes de GnRH: cGnRH-II y sGnRH. En peces óseos, cGnRH-II es la forma más conspicua. Además de esta variante, la mayoría de las especies de peces presentan también mGnRH (King y col.,1990, Sherwood y col.,1991), sGnRH (Sherwood y col.,1984, Yu y col.,1988), cfGnRH (Ngamvonchon y col.,1992; Bogerd y col.,1994), sbGnRH (Powell y col.,1994, 1996), hrGnRH (Carlosfeld y col., 2000) o pjGnRH (Montaner y col., 2000), como se ha indicado anteriormente.

La caracterización de las fracciones obtenidas por RP-HPLC con 3 sistemas de RIA distintos mostraron, en todos los casos, dos picos que eluyeron en la misma posición que las formas sintéticas: cGnRH-II y sGnRH. El paralelismo de diluciones seriadas de las fracciones inmunoreactivas de cGnRH-II y sGnRH, comparado con curvas preparadas con péptidos homólogos sintéticos, soportan las evidencias provistas en los primeros experimentos.

Se detectaron además dos pequeños picos inmunoreactivos, eluyendo entre las dos formas antes mencionadas. Las hipótesis posibles, respecto de la identidad de estos picos serían básicamente dos: la primera, es suponer que se trata de productos de degradación o precursores de alguna de las formas presentes, y que, a pesar de las modificaciones sufridas respecto de la molécula original, aún pueden ser reconocidas por los antisueros. La segunda sería suponer que se trata de una forma distinta a las conocidas y a las reconocidas por los antisueros utilizados. Respecto de la primera, es poco probable que tres antisueros poliespecíficos distintos, con distintos sitios de unión y distintas correactividades, inmunodetecten este tipo de fracciones en posiciones tan definidas y constantes como se presentan en los sistemas realizados.

En cuanto al pico menor que eluye a los 29 minutos, al momento de la escritura de este trabajo no encontramos explicación alguna; sin embargo, el pico inmunorreactivo a GnRH que eluye a los 31 minutos de corrida podría corresponder a la variante recientemente descrita y denominada pjGnRH por Montaner y col., (2000). Esto estaría de acuerdo con las nuevas evidencias que señalan que la mayoría de los teleósteos, presentan tres variantes diferentes de GnRH en el cerebro, siendo una de ellas la que posee actividad gonadotrófica en hipófisis (White y col., 1995, Stefano,

1999, Carlosfeld y col., 2000). Sin embargo para realizar una conclusión definitiva es necesario llevar a cabo una serie de pruebas de especificidad, seguidas de un aislamiento y secuenciación de la/las moléculas incógnita que permitan conocer su estructura molecular.

En peces teleósteos la hipófisis anterior está directamente inervada por fibras hipotalámicas (Peter y col., 1990). La valoración de la inmunoreactividad a GnRH en fracciones de extracto hipofisario obtenidas por RP-HPLC de fase reversa, se llevó a cabo para determinar qué forma de GnRH inerva la hipófisis de esta especie, sugiriendo de esta manera una actividad regulatoria sobre las hormonas hipofisarias. El hecho de no haber detectado inmunoreactividad en las muestras de hipófisis de *S. marmoratus*, puede deberse entre otras cosas, a que la concentración de los péptidos presentes en esta glándula es normalmente baja (el péptido sólo 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 fuera del período reproductivo. Respecto de este punto, es sabido que las concentraciones de GnRH varían con el estadio de maduración sexual en peces (Okuzawa y col., 1990, Amano y col., 1992, Dufour y col., 1993). Otra posibilidad es que la variante de GnRH que llega a la adenohipófisis no sea ninguna de las dos que se encuentran bien representadas en el tejido cerebral. En este contexto sería necesario entonces trabajar con un número mayor de hipófisis provenientes de animales maduros sexualmente para corroborar o descartar las hipótesis planteadas. La forma cGnRH-II predomina en áreas cerebrales extrahipotalámicas, mientras que la otra variante está localizada en el hipotálamo y la hipófisis (King y col., 1990; Okuzawa y col., 1990, Ngamvonchon y col., 1992; Dufour y col., 1993) y en algunos casos cGnRH-II ha sido detectada en la hipófisis (Yu y col., 1988).

La actividad gonadotrófica de las variantes de GnRH ha sido bien documentada en peces teleósteos (Ngamvonchon y col., 1992; Sherwood y col., 1993b; King y Millar, 1995) y ha sido demostrado que tanto sGnRH como cGnRH-II tienen actividad biológica en la hipófisis. Este fenómeno se debe sin duda alguna a la gran similitud molecular 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 y col., 1992; Zohar y col., 1995).

En machos, el tratamiento utilizando con sGnRH-A y domperidona indujo la maduración, la espermiogénesis y la liberación de semen por masaje abdominal. Como es sabido, la secreción de GtH en peces teleósteos es estimulada por la secreción de GnRH e inhibida por dopamina en la mayoría de las especies estudiadas (Peter y col., 1986; 1988a; 1991). El bloqueo de la acción de dopamina a través del uso de un antagonista dopaminérgico, en este caso domperidona, podría estar potenciando la actividad de GnRH en la secreción de GtH. El efecto del tratamiento fue evaluado midiendo los niveles de andrógenos séricos a diferentes tiempos durante el protocolo experimental dado que se carecía de un sistema de detección de GtH en esta especie. El sistema de RIA para testosterona usado aquí posee un 37% de reactividad cruzada con 11KT, un andrógeno considerado como característico de peces óseos (Kime, 1993). Es por ello que hablamos de “niveles séricos de andrógenos”.

A pesar que, los niveles de andrógenos se incrementaron en comparación con los controles, los niveles de E2 no fueron detectables en las mediciones efectuadas en los machos y hembras del grupo tratado. Esto podría deberse al hecho de que las gónadas de estos animales no estuvieran secretando cantidades importantes de E2 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.

Resulta interesante resaltar que, en nuestro laboratorio, utilizando este mismo tratamiento en hembras se indujo la reversión sexual del 100% de las mismas, a machos secundarios (Ravaglia y col., 1997). Estudios realizados en *M. albus* (protogínico) demostraron que la inducción con LH ovina (oLH) indujo parcialmente la reversión sexual en hembras post-puesta pero no en aquellas en época de pre-puesta (Tang y col., 1974b; Yeung y col., 1993). Sin embargo, el tratamiento en esta misma especie con varias inyecciones de homogenato de hipófisis de carpa, no indujeron la reversión pero si el crecimiento ovárico (Tao y col., 1993). Billard (1976) realizando ensayos de inducción con hCG, demostró que ciertas especies no responden al tratamiento. Si bien es altamente efectiva en la anguila japonesa (Miura, 1991) o en el goldfish (Billard, 1976), no tiene acción alguna en una especie muy relacionada como la carpa (Billard, 1989).

En conclusión, nuestros resultados han demostrado la presencia de dos variantes moleculares de GnRH. No hay hasta el momento estudios respecto de otros miembros de la familia Synbranchidae y más aún, no existen dentro del Orden, lo que nos hubiese permitido, de alguna manera, poder establecer comparaciones en relación a las variantes moleculares de esta hormona en grupos relacionados.

Por otra parte, se logró no sólo poner a punto la técnica de biopsia sino la manipulación y mantenimiento en cautiverio de esta especie así como la inducción de la espermiación en forma artificial. El análisis experimental aquí expuesto, nos ha permitido demostrar la efectividad de esta hormona sobre las funciones reproductivas sobre la base de una metodología de sencilla aplicación. El uso de un análogo superactivo de GnRH y un antagonista dopaminérgico, permitió obtener cantidades apreciables de semen, lo que abre nuevas perspectivas dentro del campo de la acuicultura de esta interesante especie protogínica diándrica. ~~~

## CONCLUSIONES GENERALES

- ❖ *S. marmoratus* presenta machos primarios y secundarios, por lo tanto es una especie protogínica diándrica para las zonas muestreadas, y no monándrica como había sido determinado por Liem (1968) para Argentina. Los machos **primarios** nacen como tales y los **secundarios** provienen de la reversión sexual de hembras funcionales.
- ❖ La proporción de machos es de un 20% para los primarios y de un 80% para los secundarios. Estos últimos poseen un IGS marcadamente menor.
- ❖ El testículo en ambos machos es impar y de tipo lobular irrestricto. Es bilobulado en los primarios y lamelar en los secundarios. Esta característica -además de la persistencia de la cavidad pseudovárica, la cavidad ovárica y una cápsula ovárica primaria en los machos secundarios- es fundamental para el diagnóstico de la protoginia.
- ❖ En *S. marmoratus*, los conductos eferentes de los machos secundarios se desarrollan dentro del tejido conectivo de neoformación. En los machos primarios se encuentran de 10 a 12 conductos eferentes ubicados centralmente.
- ❖ La proporción de revertantes fue de 9.8% y según la clasificación de Sadovy y Shapiro (1987), corresponde a una gónada “no limitada tipo I”
- ❖ Se caracterizaron los distintos estadios de la espermatogénesis, no encontrándose diferencias entre machos primarios y secundarios a nivel óptico y electrónico. Esta especie posee un tipo primitivo de SPZ, donde la cabeza es redonda, sin acrosoma y con 2 flagelos. De acuerdo con la clasificación de Mattei (1991), pertenece al “tipo I”.
- ❖ Las células de Sertoli, por sus características ultraestructurales, sintetizarían esteroides y proteínas.

- ❖ El tejido intersticial en ambos tipos de machos no sufre modificaciones a lo largo del año y es importante destacar la abundancia de fibras colágenas, en especial en los machos primarios. Las células de Leydig son prominentes tanto al microscopio óptico como al electrónico y poseen características típicas de células esteroidogénicas, lo cual ha sido confirmado por la presencia de 3 $\beta$ -HSD.
- ❖ Se describieron cinco clases reproductivas durante el ciclo anual basándose en los cambios naturales del epitelio germinal y en la preponderancia de los diferentes estadios de la espermatogénesis.
- ❖ El crecimiento de los lóbulos se lleva a cabo por medio de ramificaciones desde la región proximal hacia la distal y parecería que el tejido intersticial crece en sentido opuesto. Los testículos alcanzan su mayor tamaño durante la maduración final (diciembre-marzo).
- ❖ En *S. marmoratus*, la espermatogénesis se desarrolla a lo largo del año y esto fue puesto en evidencia por el número de células en proliferación. Entre estaciones de cría, permanece una población residual de células de Sertoli y germinales demostrándose así la presencia de un epitelio germinal permanente.
- ❖ Los criterios histológicos utilizados aquí, para definir clases reproductivas son fácilmente identificables y podrían ser aplicados a otras especies de teleósteos. La clasificación propuesta, permitiría la unificación de la nomenclatura, la cual hasta el momento es anárquica.
- ❖ Los resultados obtenidos al analizar los extractos de cerebro, sugieren que *S. marmoratus* tiene al menos dos variantes diferentes de GnRH: cGnRH-II y sGnRH. Se detectaron además dos pequeños picos inmunoreactivos. El que eluye a los 31 minutos, podría corresponder a la variante recientemente descrita y denominada pjGnRH (variante pejerrey).

- ❖ Utilizando un análogo superactivo de GnRH y un antagonista dopaminérgico, se indujo la maduración, la espermiogénesis y la liberación de semen por masaje abdominal de un 50 % de machos a la tercera semana, y de un 100% de los mismos a partir de la quinta semana de tratamiento (49 días). Esto se corroboró a nivel histológico y evaluando los niveles de andrógenos en sangre respecto de los animales control. El diseño experimental propuesto aquí, es un paso fundamental para lograr inseminación artificial y cría en cautiverio.

Los resultados obtenidos en este trabajo, representan aportes originales al conocimiento de esta especie de potencial importancia económica. Esta especie es un buen modelo experimental que podrá ser utilizado en nuevas líneas de investigación sobre la biología reproductiva de los peces de agua dulce y permitirá la comprensión de los mecanismos que encierra el cambio de sexo...



**DRA. GRACIELA A. GUERRERO**  
EMBRIOLOGIA ANIMAL  
FCEN - UBA



F. Lozano

## BIBLIOGRAFÍA

### INTRODUCCIÓN GENERAL

**BALDISSEROTTO, B., MIMURA, O. y SALOMÃO, L.** (1993). Effect of pH ion and water transport in the gut of the freshwater teleost, *Synbranchus marmoratus*. Journal of the Brazilian Association for the Advance of Science. Ciencia y Cultura. Pp. 396-398.

**BICUDO, J.E.P. and JOHANSEN, K.** (1979). Respiratory gas exchange in the airbreathing fish, *Synbranchus marmoratus*. Environmental Biology of Fishes. 4: 55-64.

**BLOCH, M.E.** (1795). Naturgeschichte der ausländischen Fische. Berlin. v. 9: i-ii + 1-192, Pls. 397-429. Also a French edition, Ichthyologie, ou Histoire naturelle des Poissons, v. 12, published 1797.

**BLOCH, M.E.** (1795-1797). Ichthyologie, ou Histoire naturelle, générale et particulière des poissons. Avec des figures enluminées dessinées d'après nature. In 12 parts. Berlin. (French transl. and revision of Bloch's Allgemeine Naturgeschichte der Fische).

**BONETTO, A.A. y CORDIVIOLA DE YUAN, E.** (1969). Ciclos hidrológicos del río Paraná y las poblaciones de peces en ambientes lenticos permanentes del Paraná Medio. Physis, Secc. B, Buenos Aires. 29 (78): 213-223.

**BONETTO, A.A.** (1976). Calidad de las Aguas del río Paraná - Introducción a su estudio ecológico. Santa Fe. Dir. Nac. de Const. Portuarias. INCYTH. Prog. de las Nacs. Unidas para el Desarrollo. Oficina de Cooperación Técnica de la ONU. pp. 202.

**CIONE, A.L. and BARLA, M.J.** (1997). A new locality for the Synbranchid eel *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Percomorpha) in Southern Buenos Aires Province, Argentina. Neotropica 43 (109): 113-115.

**COLCIENCIAS-INDERENA.** (1985). Programa Nacional para el Desarrollo de la Acuicultura. Bogotá, Colombia, 126 pp.

**CORDERO BLEIZEFFER, R. G.** (2000). "Descripción osteológica de *Ophisternon aenigmaticum* (Pisces, Synbranchidae)". Facultad de Ciencias de la UNAM. 122 pp.

**CORDIVIOLA DE YUAN, E. and PIGNALBERI DE HASSAN, C.** (1985). Fish population in the Paraná River: lentic environments of Diamante and San Pedro Areas (Argentine Republic). Hydrobiologia. 127: 213-218.

**FERNÁNDEZ, L.A. y BUTÍ, C.** (1996). Nuevas localidades para peces de agua dulce de la República Argentina. Acta Zoologica Lilloana. V. 43 (No. 2): 251-272.

**GÓMEZ, S.E. y CHEBEZ, J.C.** (1996). Peces de la provincia de Misiones. Fauna Misionera. Catálogo sistemático y zoogeográfico de los vertebrados de la Provincia de Misiones (Argentina). L.O.L.A., Buenos Aires. 39-70.

**GRAHAM, J.T.** (1981). Burrowing and amphibious life of of the swamp eel *Synbranchus marmoratus*. Amerian Zoologist. 21: 995.

**GRAHAM, J; and BAIRD, T.** (1984). The transition of air breathing in fishes. III. Effects of body size and aquatic hypoxia on three aerial gas exchange of the swamp ell *S. marmoratus*. Journal of Experimental Biology Edinburgh. 108:357.375.

**GRAHAM, J, BAIRD, T. and STOCKMANN, W.** (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*. Journal of Experimental Biology. 129: 83-106.

**GRAHAM, J.T.** (1994). An evolutionary perspective for bimodal respiration: A biological synthesis of fish air breathing. American Zoologist. 34:229-237.

**GRAHAM, J., LAI, N.C., CHILLER, D and ROBERTS, J.** (1995). The transition to air breathing in fishes. V. Comparative aspects of cardiorespiratory regulation

in *Synbranchus marmoratus* and *Monopterus albus* (Synbranchidae). Journal of Experimental Biology. 198: 1455-1467.

**HUBBS, C.L.** (1938). Fishes from the caves of Yucatán. En: Pearse, A. S. (ed.): Fauna of the caves of Yucatán. Carnegie Inst. Washington publ. No. 491, pp.261-295.

**KARDONG, K.V.** (1998). Vertebrates. Comparative anatomy, function, evolution. McGraw-Hill Eds. Boston, Massachusetts. Pp. 747.

**LAUDER, G. F. and LIEM, K.** (1983). The evolution and interrelationships of actinopterygian fishes. Bulletin of the Museum Comparative Zoologist. 150: 95-197.

**LÜLING, K.H.** (1980). Biotop, begleitfauna und amphibischen lebensweise von *Synbranchus marmoratus* (Pisces, Synbranchidae) in seitengenvassem des mittleren Paraná (Argentinien). Bonn. Zool. Beitr. (1/2): 111-143.

**MARLIER, G.** (1967). Ecological studies on some lakes of the Amazon valley. Amazoniana, 1: 91-115. Citado en: Welcomme, R. L. 1992. Pesca fluvial. FAO. Documento técnico de Pesca No. 262. Roma, FAO. Pp. 303.

**MUNSHI, J.S.D. and SINGH, B.N** (1968). On the respiratory organs of *Amphipnous cuchia* (Ham. Buch.). Journal of Morphology, 124: 423-444.

**MUNSHI, J.S.D., OLSON, K.R., GHOSH, T.K. and OJHA, J.** (1990). Vasculature of the head and respiratory organs in an obligate air-breathing, the swamp eel *Monopterus albus* (= *Amphipnous*) *Cuchia*. Journal of Morphology, 203: 181-201.

**NELSON, J.** (1994). Fishes of the world. 3<sup>rd</sup>. Edition. (John Wiley and Sons, Inc.). New York. Pp. 600.

**OLAZARRI, J.** (1961). Sobre moluscos en el contenido estomacal de la anguila común, *Synbranchus marmoratus* Bl. Com. Soc. Malac. Urug., 1 (1): 9-10.

**RINGUELET, R.A., R.H. ARAMBURU y ARAMBURU, A.A.** (1967). Los peces Argentinos de Agua Dulce. Comisión de investigación científica, Gobernación de la Provincia de Buenos Aires, La Plata, 602 pp.

**RODRIGUEZ, M.** (1999). El espectro trófico de juveniles de *Synbranchus marmoratus* (Synbranchiformes, Synbranchidae). Iheringia, Ser. Zool, Porto Alegre. 86: 137-143.

**ROSA, L.L.** (1977). Respiração de *Synbranchus marmoratus*. Pisces-Teleostei-na agua e no ar. Bolletim da Fisiologia Animal, Univ. São Paulo, 1: 39-70.

**ROSEN, D. and RUMNEY, A.** (1972). Evidence of a second species of *Synbranchus* (Pisces, Teleostei) in South America. American Museum Novitates, N° 2497, pp. 1-45.

**ROSEN, D.E. and GREENWOOD, P.H.** (1976). A fourth neotropical species of synbranchid eel and the phylogeny and systematics of synbranchiform fishes. Bulletin of the American Museum of Natural History. 157 (art. 1): 1-69.

**SADOVY, I. and SHAPIRO, D.** (1987). Criteria for the diagnosis of hermaphroditism in fishes. Copeia 1, 136-156.

**SAWAYA, P. and PICCOLO, R.** (1979). Respiratory Mechanism of tropical air-breathing fishes. Gills morphometry. Measurement of gill area. Bolletim da Fisiologia Animal, Univ. São Paulo, 3: 9-15.

**TAYLOR, M.** (1913). The development of *S. marmoratus*. Quarterly Journal of Microscopy Science. London, 59: 1-51.

**THURSTON, R.V. and GEHRKE, P.C.** (1993). Respiratory oxygen requirements of fishes: description of the OXYREF, a dat file based on test results reported in the published literature. Pp. 95-108. In R.C. Russo and R.V. Thurston (eds). Fish Physiology, Toxicology and Water Quality Management. Proceedings of an International Symposium. Sacramento, California, USA. Sept. 18-19, 1990.

## **CAPITULO I**

- ASFZELIUS, B.A.** (1978). Fine structure of the garfish spermatozoon. *Journal of Ultrastructure research*. 64: 309-314.
- AHSAN, S.N.** (1966). Cyclical changes in the testicular activity of the lack chub, *Couesius plumbeus* (Agassiz). *Canadian Journal of Zoology*. 44: 149-159.
- BACCETTI, B.** (1979). The evolution of the acrosome complex. In Fawcett, D.W. and Bedford, J. M. (eds): *The Spermatozoon*. Baltimore-Munich: Urban and Schwarzenberg. Pp. 305-329.
- BILLARD, R.** (1969a). La spermatogénèse de *Poecilia reticulata*. I. Estimation du nombre de générations goniales et rendement de la spermatogénèse. *Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique*. 9: 251-271.
- BILLARD, R.** (1970a). Ultrastructure comparée de spermatozoides de quelques poissons Teleostéens. In *Comparative Spermatology* (ed. B. Bacetti). Academic Press, New York. Pp. 71-79.
- BILLARD, R.** (1970b). La spermatogénèse de *Poecilia reticulata*. III. Ultrastructure des cellules de Sertoli. *Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique*. 10: 37-50.
- BILLARD, R. and JALABERT, B.** (1972). Les cellules de Sertoli des poissons téléostéens. 1: étude ultrastructurale. *Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique*. 12: 19-32.
- BILLARD, R. and GUINSBURG, A.S.** (1973). La spermiogénèse et le spermatozoïde d'*Anguilla anguilla* L. Étude ultrastructurale. *Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique*. 13: 523-534.
- BILLARD, R., FOSTIER, A., WEIL, C., and BRETON, B.** (1982). Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Canadian Journal of Fish Aquatic Sciences*. 39: 65-79.
- BILLARD, R.** (1983a). Ultrastructure of trout spermatozoa: changes after dilution and deep-freezing. *Cell and Tissue Research*. 228: 205-218.
- BILLARD, R.** (1983b). Spermiogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Cell and Tissue Research*. 233: 265-284.
- BILLARD, R.** (1986). Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reproductive and Nutrition Development*. 26 (4): 877-920.
- BOISSON, C., MATTEI, X. and MATTEI, C.** (1968a). Le spermatozoïde de *Dactylopterus volitans*, Linne (Poisson, Cephalacanthidae), étudié au microscope électronique. *Comptes Rendus des Seances de la Société de Biologie de l'ouest Africain*. 162: 820-823.
- BRAUN, R.E., PESCHON J.J., BEHRINGER, R., BRINSTER, R. and PALMITER, R.** (1989). Protamine 3'untranslated sequences regulate temporal translational control and subcellular localization of growth hormone in spermatids of transgenic mice. *Genes and Development*. 3: 793-802.
- BRUSLE, S.** (1981). Ultrastructure of spermiogenesis in *Liza aurata* Riso, 1810 (Teleostei, Mugilidae). *Cell and Tissue Research*. 217: 415-424.
- BURNS, J.R., WEITZMAN, S.H., GRIER H.J. and MENEZES, N.A.** (1995). Internal fertilization, testis and sperm morphology in the glandulocaudine fishes (Teleostei: Characidae: Glandulocaudinae). *Journal of Morphology*. 224: 131-145.
- BURNS, J.R., WEITZMAN, S.H., LANGE, K.R. and MALABARBA, L.R.** (1998). Sperm ultrastructure in characid fishes. In: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*, L. R. Malabarba, R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena and C. A. S. Lucena (Eds.). Edipucrs, Porto Alegre, Brazil. Pp. 235-244.

**CALLARD, G., MAK, P., DIBOIS, W. and CUEVAS, M.E.** (1989). Regulation of spermatogenesis: the shark testis model. *Journal of Experimental Zoology* 2 (suppl. 2): 23-34.

**CALLARD, I.P., CALLARD, G.V., LANCE, V., BOLAFFI, J.L. and ROSSET, J.S.** (1978). Testicular regulation in nonmammalian vertebrates. *Biology of Reproduction. Review*. 18(1):16-43.

**CAUTY, C. and LOIR, M.** (1995). The interstitial cells of the trout testis (*Onchorynchus mykiss*): ultrastructural characterization and changes throughout the reproductive cycle. *Tissue and Cell*. 27, 383-395.

**COCHRAN R.C. and GRIER, H. J.** (1991). Regulation of sexual succession in the protogynous black sea bass, *Centropristis striatus* (Osteichtys: Serranidae). *General and Comparative Endocrinology*. 82:69-77.

**ÇOLAK, A. and YAMAMOTO, K.** (1974a). An electron microscope study of spermiogenesis in the Japanese Eel, *Anguilla japonica*. *Bulletin of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University*. 25: 1-5.

**COLE, K.S.** (1983). Protogynous hermaphroditism in a temperate zone territorial marine goby, *Coryphopterus nicholsi*. *Copeia*. 809-812.

**COLE, K.S. and ROBERTSON, D. R.** (1988). Protogyny in the Caribbean reef goby, *Coryphopterus personatus*: gonad ontogeny and social influences on sex-change. *Bulletin of Marine Science*. 42: 317-333.

**CHAN, S.T.H. and PHILLIPS, J.G.** (1967). Seasonal changes in the distribution of gonadal lipids and spermatogenetic tissue in the male phase of *Monopterus albus* (Pisces: Teleostei). *Journal of Zoology London*. 152: 31-41.

**DADONE, L. and NARBAITZ, R.** (1967). Submicroscopic structure of spermatozoa of a cyprinidontiform teleost, *Jenynsia lineata*. *Zeitschrift fur Zellforschung* 80: 214-219.

**DE ROOIJ, D.G. and GROOTEGOED, J.A.** (1998). Spermatogonial stem cells. *Current Opinion in Cell Biology*. 10:565-567.

**DODD, J.M.** (1972). The endocrine regulation of gametogenesis and gonad maturation in fishes. *General and Comparative Endocrinology. Suppl.* 3: 675-687.

**DODD, J.M. and SUMPTER, J.P.** (1984). Fishes. In: Lamming G. E. ,eds., *Marshall's Physiology of Reproduction*, vol. 1. New York, Churchill Livingstone. 1-79.

**DOWNING, A.L. and BURNS, J.R.** (1995). Testis morphology and spermatozeugma formation in three genera of viviparous halfbeaks: *Nomorhamphus*, *Dermogenys* and *Hemirhamphodon* (Teleostei: Hemiramphidae). *Journal of Morphology*. 225:329-343.

**EMEL'YANOVA, N. and MAKAYEVA, A.** (1991). Morphology of gametes in the channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Journal of Ichthyology*. 31: 10-16.

**EMEL'YANOVA, N. and MAKAYEVA, A.** (1992). Ultrastructure of the spermatozooids of some representative catfishes. *Journal of Ichthyology*. 32: 127-134.

**FERREIRA, B.P.** (1995). Reproduction of the common coral trout *Plectropomus leopardus* (Serranidae, Epinephelinae) from the central and northern great barrier reef, Australia. *Bulletin of Marine Science*. 56 (2): 653-669.

**FISHER, E.A.** (1981). Sexual allocation in a simultaneously hermaphroditic reef Fish, *Hypoplectrus nigricans*. *American Naturalist*. 117: 64-82.

**FISHER, R.A.** (1983). Protandric sex reversal in *Gonostoma elongatus* (Pisces: Gonostomidae) from the eastern Gulf of México. *Copeia*. 554-557.

- FOLLENIUS, E. and PORTE, A.** (1960). Cytologie fine des cellules interstitielle du testicule du poisson *Lebistes reticulatus* R. *Experientia* 16, 190-192.
- FOLLENIUS, E.** (1968). Cytologie et cytophysiologie des cellules interstitielles de L'Épinoche: *Gasterosteus aculeatus* L. Étude au microscope électronique. *General and Comparative Endocrinology*. 11, 198-219.
- FRANCIS, R.C.** (1992) Sexual lability in teleosts: Developmental factors. *The Quarterly Review of Biology*. 67: N 1: 1-17.
- GARDINER, D.M.** (1978b) Fine structure of the spermatozoon of the viviparous teleost, *Cymatogaster aggregata*. *Journal of Fish Biology*. 13: 435-439.
- GRESIK, E.W.; QUIRK, J.G. and HAMILTON, J.B.** (1973b). Fine structure of the Sertoli cell of the testis of the teleost *Oryzias latipes*. *General and Comparative Endocrinology*. 21: 341-352.
- GRESIK, E.W.** (1975). Homologous of Leydig and Sertoli cells in the testis of the teleost *Oryzias latipes*. In M. Hess eds. *Electron microscopic concepts of secretion*. John Wiley, New York. Pp. 300.
- GRIER, H.** (1975). Aspects of germinal cyts and sperm development in *Poecilia latipinna*. *Journal of Morphology*. 146: 229-250.
- GRIER, H.** (1976). Sperm development in the teleost *Oryzias latipes*. *Cell and Tissue Research*. 168: 419-431.
- GRIER, H. and LINTON, J.R.** (1977). Ultrastructural identification of the Sertoli cell in the testis of the northern pike, *Esox lucius*. *American Journal of Naturalist*. 149: 283-288.
- GRIER, H., FITZSIMONS, J. and LINTON, J.** (1978). Structure and ultrastructure of the testis and sperm formation in goodeid teleosts. *Journal of Morphology* 156: 419-438.
- GRIER, H.** (1981). Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *American Zoologist*. 21: 345-357.
- GRIER, H. and ABRAHAM, M.** (1983). A model for testicular recrudescence in *Oreochromis aureus*. In: *Proceedings of the "International Symposium on Tilapia in Aquaculture"* (L. Fishelson and Z. Yaron, eds.), Tel Aviv University Press, Tel Aviv, Israel. Pp. 200-209.
- GRIER, H., TAYLOR, R.G. and REESE, R.O.** (1987). The mechanism of tubule elongation during testicular recrudescence in the redbfish, *Scaenops ocellatus* (Perciformes). In *Proceedings of the V Congress of European Ichthyologist, Stockholm 1985*. Kullander S.O., Fernholm B., editors. Stockholm Swedish Museum of Natural History. 285-291.
- GRIER, H., VAN der HURK, R. and BILLARD, R.** (1989). Cytological identification of cell types in the testis of *Esox lucius* and *Esox niger*. *Cell and Tissue Research*. 257: 491-496.
- GRIER, H.** (1993). Comparative Organization of Sertoli Cells Including the Sertoli Cell Barrier. In: *Rusell L. D., Griswold MD editors. The Sertoli cell*. Clearwater, FL. Cache River Press. 704-739.
- GRIER, H. and TAYLOR, R.** (1998). Testicular maturation and regression in the common snook. *Journal of Fish Biology*. 53: 521- 542.
- GUHA, T., SIDDIQUI, A.Q. and PRENTIS, P.F.** (1988). Ultrastructure of testicular spermatozoon of the fish *Oreochromis niloticus*. In: *Proceedings of the 46th Annual Meeting of the Electron Microscopy Society of America*. (Ed. by G. W. Bailey), pp. 278-279. San Francisco: San Francisco Press, Inc.
- GURAYA, S.S.** (1976b). Recent advances in the morphology, histochemistry, and biochemistry of steroid-synthesizing cellular sites in the testes of nonmammalian vertebrates. *International Review of Cytology*. 47: 99-136.

- HARRINGTON, R.W. Jr.** (1971) How ecological and genetic factors interact to determine when self-fertilizing hermaphrodites of *Rivulus marmoratus* change into functional secondary males, with reappraisal of the modes of intersexuality in the animal kingdom. Springer, Berlín. 249-262.
- HASTING, P.A. and BORTONE, S.A.** (1980). Observations on the life history of the belted sandfish, *Serranus subligarius* (Serranidae). Environmental Biology of Fishes. 5: 365-374.
- HASTING, P.A.** (1981) Gonadal morphology and sex succession in the protogynous hermaphrodite *Hemianthias vivamus* (Jordan and Swain). Journal of Fish Biology. 18: 443-454.
- HECHT, T. and BAIRD, D.** (1977). Contributions to the biology of the panga, *Pterogymnus lanarius* (Pisces: Sparidae): age, growth and reproduction. Zool. Afr., 12: 363-372.
- HOAR, W.S.** (1969). Reproduction. In "Fish Physiology" (W.S. Hoar and D.J. Randall, eds.). 3: 1-72. Academic Press, New York.
- HOAR, W.S. and NAGAHAMA, Y.** (1978). The cellular sources of sex steroids in the teleosts gonads. Annales de Biologie Animal, Biochemistry et Biophysiques. 18: 893-898.
- JAFRI, S.I.H. and ENSOR, D.M.** (1979) Occurrence of an intersex condition in the roach *Rutilus rutilus* (L.). Journal of Fish Biology. 15: 547-549.
- JAMIESON, B.** (1986a). Onychophoran-euclitel-late relationships: evidence from spermatozoal ultrastructure. Zoologica Scripta. 15: 141-155.
- JAMIESON, B.** (1986b). Some recent studies on the ultrastructure and phylogeny of annelid and uniramian spermatozoa. Development Growth and Differentiation. 28 (suppl.): 25-26.
- JAMIESON, B.** (1989). Complex spermatozoon of the live-bearing half-beak, *Hemirhamphodon pogonognathus* Bleeker: ultrastructural description (Euteleostei, Atherinomorpha, Beloniformes). Gamete Research 24: 247-259.
- JAMIESON, B.** (1991). Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa. Cambridge University Press. Pp 1-319.
- JAMIESON, B.G.M., AUSIO, J. and JUSTINE, J.L.** (1995). Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy. Mém. Mus. Natn. Hist. Nat. 166: 564.
- JESPERSEN, A.** (1984). Spermatozoans from a parasitic dwarf male of *Neoceratias spinifer* Pappenheim, 1914. Videnskabelige Meddelelser Dansk Naturhistorisk Forening. 145: 37-42.
- KWEON, H.S., PARK, E.H. and PETERS, N.** (1998). Spermatozoon ultrastructure in the internally self-fertilizing hermaphroditic teleost, *Rivulus marmoratus* (Cyprinontiformes, Rivulidae). Copeia. 1101-1106.
- LAHNSTEINER, F. and PATZNER, R.A.** (1991). A new method for electron-microscopical fixation of spermatozoa of freshwater teleosts. Technical Paper Aquaculture. 97: 301-304.
- LAHNSTEINER, F., BERGER, B., WEISMAN, T. and PATZNER, R.** (1995). Fine structure and motility of spermatozoa and composition of the seminal plasma in the perch. Journal of Fish Biology. 47, 492-508.
- LAVETT SMITH, C.** (1967). Contribution to a theory of hermaphroditism. Journal of Theoretical Biology. 17: 76-90.
- LEATHERLAND, J.F. and SONSTEGARD, R.A.** (1978). Structure of normal testis and testicular tumors in cyprinids from Lake Ontario. Cancer Research. 38: 3164-3173.

- LEGENDRE, M., LINHART, O. and BILLARD, R.** (1996) Spawning and management of gametes, fertilized eggs and embryos in Siluroidei. *Aquatic Living Resources*. 9: 59-80.
- LEONARD, J.L.** (1993) Sexual conflict in simultaneous hermaphrodites: evidence from serranid fishes. *Environmental Biology of Fishes* 36: 135-148.
- LEUNG, L.K.** (1987a). Fish spermatology. Ultrastructure, phylogeny and cryopreservation. Honours thesis, University of Queensland (unpublished).
- LEUNG, L.K.** (1988). The ultrastructure of the spermatozoon of *Lepidogalaxias salamandroides* and its phylogenetic significance. *Gamete Research* 19: 41-49.
- LIEM, K.F.** (1963). Sex reversal as a natural process in the Synbranchiform fish *Monopterus albus*. *Copeia*. 303-312.
- LIEM, K.F.** (1968). Geographical and taxonomic variation in the pattern of natural sex reversal in the teleost fish order Synbranchiformes. *Journal of Zoology London*. 156: 225-238.
- LIU, C.K.** (1944). Rudimentary hermaphroditism in the synbranchoid eel, *Monopterus javanensis*. *Sinensia* 15: 1-8.
- LOFTS, B. and BERN, H.A.** (1972). The functional morphology of steroidogenic tissues. In "Steroids in Nonmammalian Vertebrates". Academic Press, New York. 37-125.
- LOIR, M., MARGERIDON, A. and CAUTY, C.** (1989). Leydig cells in *Myleus ternetzi* testes. *Aquatic Living Resources*. 2: 57-61.
- LOIR, M.** (1990a). Trout steroidogenic testicular cells in primary culture. 2: Steroidogenic activity of interstitial cells, Sertoli cells and spermatozoa. *General and Comparative Endocrinology*, 78: 388-398.
- LOIR, M.** (1990b). Interstitial cells from the testis of the trout *O. mykiss* in vivo and in primary culture. *Cell and Tissue Research*. 261: 133-144.
- LONNBERG, E. and GUSTAFSON, G.** (1937). Contributions to the life history of the striped wrasse, *Labrus ossifagus*. *Lin. Ark. Zool.* 29A: 1-16.
- MAGGESE, M.C.; CUKIER, M. and CUSSAC, V.** (1984). Morphological changes, fertilizing ability and motility of *Rhamdia sapo* (Pisces, Pimelodidae) sperm induced by media of different salinities. *Revista Brasileira de Biologia*. 44: 541-546.
- MARSHALL, A.J., and LOFTS, B.** (1956). The Leydig-cell homologue in certain teleost fishes. *Nature (London)*. 177, 704-705.
- MARSHALL, C.J.** (1989). Cryopreservation and ultrastructural studies on teleost fish gametes. Honours thesis, University of Queensland (unpublished).
- MARTOJA, R. y MARTOJA PIERSON, M.** (1970). Técnicas de histología Animal. Toray Masson, Barcelona. Pp. 341.
- MATTEI, X., BOISSON, C.; MATTEI, C. and REIZER, C.** (1967a). Spermatozoides aflagelles chez poisson: *Gymnarchus niloticus* (Teleostes, Gymnarchidae). *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences*. 265: 2010-2012.
- MATTEI, X.** (1967b). Extrémité flagellaire du spermatozoïde de *Lebistes reticulatus* (Poeciliidae). *Comptes Rendus des Seances de la Société de Biologie de l'Africain*. 161: 884-887.
- MATTEI, X.** (1969). Contribution a l'étude de la spermiogenese et des spermatozoides de poissons par la methode de la microscopie electronique. Hese Doctoral d'état, Sciences, Montpellier, AO 3263. Pp. 148.
- MATTEI, X.** (1970). Spermiogenèse comparée des poissons. In: *Comparative Spermatology*. (Ed. by B. Baccetti), New York: Academic Press. pp. 57-69.
- MATTEI, X., MATTEI, C., REIZER, C. and CHEVALIER, J.L.** (1972). Ultrastructure des spermatozoides aflagellés des Mormyres (Poissons, Téléostéens). *Journal Microscopie*. 15: 67-78.

- MATTEI, X. and MATTEI, C.** (1972a). L'appareil collaire et flagellaire du spermatozoide d'*Albi vulpes* (Poissin, Albulidae). *Journal Microscopie*. 14: 67a-68a.
- MATTEI, C and MATTEI, X.** (1974). Spermatogenesis and spermatozoa of the elomorpha (Teleost fish). In *The Functional Anatomy of the Spermatozoon* (B. A. Asfzelius, ed.), Pergamon Press, Oxford. pp. 211-221.
- MATTEI, C. and MATTEI, X.** (1976). Présence d'un système membranaire associé au noyau dans le gamète de *Pomacentrus leucostictus* (Poisson Téléostéen). *Comptes Rendus des Seances de la Société de Biologie*. 170, 234-240.
- MATTEI, X.** (1978b). La spermiogenese d'un poisson teleosteen (*Lepadogaster lepadogaster*). II – Le spermatozoide. *Biologie Cellulaire* 32: 267-274.
- MATTEI, C., MATTEI, X. and MARCHAND, B.** (1979). Réinvestigation de la structure des flagelles spermatiques: Les doublets 1 2 5 et 6. *Journal of Ultrastructural Research*. 69, 371-377.
- MATTEI, X.** (1988). The flagellar apparatus of spermatozoa in fish. *Ultrastructure and evolution. Biology of the Cell*. 63: 151-158.
- MATTEI, X., THIAM, D. and THIAW, O.T.** (1989). Le spermatozoide de *Ophidion* sp. (Poisson, Teleostéen): particularites ultrastructurales ou flagèlle. *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research*. 102: 162-169.
- MATTEI, X.** (1991). Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. *Canadian Journal of Zoology*. 69: 3038-3055.
- MIURA, T., YAMAUCHI, K.; NAGAHAMA, Y and TAKAHASHI, H.** (1991a). Induction of spermatogenesis in male Japanese eel, *Anguilla japonica*, by a single injection of human chorionic gonadotropin. *Zoological Science* 8: 63-73.
- MOYER, J.T. and NAKAZONO, A.** (1978b). Protandrous hermaphroditism in six species of the anemonefish genus *Amphiprion* in Japan. *Japan Journal Ichthyology*. 25: 101-106.
- NAGAHAMA, Y.Y., CLARKE, W.C. and HOAR, W.S.** (1978). Ultrastructure of putative steroid-producing cells in the gonads of coho, *Oncorhynchus kisutch* and pink salmon, *O. gorbuscha*. *Canadian Journal of Zoology*. 56: 2508-2519.
- NAGAHAMA, Y.; KAGAWA, H. and YOUNG, G.** (1982). Cellular sources of sex steroids in teleost gonads. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 39: 56-64.
- NAGAHAMA, Y.** (1983). The functional morphology of teleost gonads. In: Hoar W, Randall DJ, Donaldson EM. *Fish Physiology*. Academic Press. Vol. 9, Part A p. 433.
- NAGAHAMA, Y.** (1986). Testis. In: Pang, P. K. T., Schreibam, M. P., Gorman, A. (eds.). *Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications*. Academic Press, New York. 1: 399-437.
- NICHOLLS, T.J. and GRAHAM, G.P.** (1972). The ultrastructure of lobule boundary cells and Leydig cell homologs in the testis of a cichlid fish, *Cichlasoma nigrofasciatum*. *General and Comparative Endocrinology*. 19: 133-146.
- O'HALLORAN, M.J. and IDLER, D.R.** (1970). Identification and distribution of the Leydig cell homolog in the testis of sexually mature Atlantic salmon (*Salmo salar*). *General and Comparative Endocrinology*. 15: 361-364.
- OKADA, Y.K.** (1964). Effects of androgen and estrogen on sex reversal in the wrasse, *Halichoeres poecilopterus*. *Proceedings of Japan Academy*. 40: 541-544.
- OKADA, Y.K.** (1966). Observations on the sex reversal in the synbranchoid eel, *Fluta alba* (Zuiew). *Proceedings of Japan Academy*. 42: 491-496.
- OOTA, I. and YAMAMOTO, K.** (1966). Interstitial cells in the immature testes of the rainbow trout. *Anatomical Zoologist of Japan*. 39: 142-148.
- PANDIAN, T.J. and SHEELA, S.G.** (1995). Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture*. 138: 1-22.

- PAVLOV, D., KNUDSEN, P., EMEL'YANOVA, N. and ERLAND, M.** (1997). Spermatozoon ultrastructure and sperm production in wolffish (*Anarhichas lupus*), a species with intrenal fertilization. *Aquatic Living Resources*. 10: 187-194.
- PEARSE, A.G.E.** (1985). *Histochemistry Theoretical and applied*. Vol. 2. Analytical Technology. 4ª edición. Livingstone, New York. Pp 1055.
- POIRIER, G.R. and NICHOLSON, N.** (1982). Fine structure of the testicular spermatozoa from the Chanel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of Ultrastructure Research*. 80: 104-110.
- PORTE, A. and FOLLENIUS, E.** (1960). La spermiogénèse chez *Lebistes reticulatus*. Étude au microscope électronique. *Bulletin de la Société Zoologique de France*. 85: 82-88.
- PUDNEY, J.** (1996). Comparative Cytology of the Leydig Cell. In: *The Leydig Cell*. Payne, A., Hardy, M., and Rusell, L. Eds. Cache River press. Pp. 97-142.
- PUDNEY, J.** (1998). Leydig and Sertoli Cells, Nonmammalian. *Encyclopedia of Reproduction*. Vol. 2. Eds. Knobil, E. and Neill, J. pp1008- 1021.
- PURDOM, C.E.** (1984). Atypical modes of reproduction in fish. *Oxford Review in Reproductive Biology*. 6: 303-40.
- PUSEY, B.J. and STEWART, T.** (1989). Internal fertilization in *Lepidogalaxias salamandroides* Mees (Pisces, Lepidogalaxiidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 97: 69-79.
- QUINTIERO-HUNTER, I., GRIER, H. and MUSCATO, M.** (1991). Enhancement of histological detail using metanil yellow as counterstain in periodic acid Schiff's hematoxylin staining of glycol methacrylate tissue sections. *Biotechnic and Histochemistry* 66: 169-172.
- 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. and MAGGESE, M.C.** (1995). Melanomacrophage centres in the swamp eel *S. marmoratus* (Bloch, 1795) (Pisces, Synbranchiformes). *Journal of Fish Diseases*. 18: 140-146.
- RAVAGLIA, M.** (2000). Biología reproductiva de la anguila criolla *Synbranchus marmoratus* Bloch 1795 (Teleostei, Synbranchidae). Oogénesis e inducción hormonal de de la maduración final. Tesis Doctoral. Depto de Cs. Biologicas, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- REINBOTH, R.** (1962). Morphologische und funktionelle Zweigeschlechtlichkeit bei marinen Teleostiern (Serradnidae, Sparidae, Centranchidae, Labridae). *Zoologische Jahrbucher Physiologie*. 69: 405-480.
- REINBOTH, R.** (1983). The peculiarities of gonad transformation in teleosts. *Differentiation* 23 (suppl.): 82-86.
- REINBOTH, R.** (1988). Physiological problems of teleost ambisexuality. *Environmental Biology of Fish*. 22: 4, 249-259.
- REINBOTH, R. and BRUSLE-SICARD, S.** (1997). Histological and ultrastructural studies on the effects of hCG on sex inversion in the protogynous teleost *Coris julis*. *Journal of Fish Biology*. 51: 738-749.
- ROBERTSON, D.R. and WARNER, R.R.** (1978). Sexual patterns in the labroid fishes of the Western Caribbean II. The parrotfishes (Scaridae) *Smithsonian Contribution of Zoology*. 255: 1-26.
- ROEDE, M.J.** (1975). Reversal of sex in several labrid fish species. *Publicazioni della Stazione Zoologica di Napoli*. 39 (suppl.) 595 - 617.
- ROMAGOZA, E., NARAHARA, M.I., BORELLA, M.I., PARREIRA, S.F. and FENERICH-VERANI, N.** (2000). Ultrastructure of the germ cells in the testis of

matrinxã, *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) (Teleostei, Characidae). Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Symposium on the Reproductive Physiology of fish. Bergen, Norway, 2000. Pp. 261.

**ROOSEN-RUNGE, E.C.** (1977). The process of spermatogenesis in animals. Cambridge University Press, London and New York.

**ROSS, R. M., LOSEY, G.S. and DIAMOND, M.** (1983). Sex change in coral reef fish: dependence of stimulation and inhibition on relative size. *Science*. 221: 574-575.

**ROUSE, G.W. and JAMIESON, B.** (1987). An ultrastructural study of the spermatozoa of the polychaetes *Eurythoe complanta* (Amphinomidae), *Clymenella* sp. and *Micromaldane* sp. (Maldanidae), with definition of sperm types in relation to reproductive biology. *Journal of Submicroscopic Cytology*. 19: 573-584.

**RUSSO, J. and PISANO, A.** (1973). Some ultrastructural characteristics of *Platypoecilus maculatus* spermatogenesis. *Bolletín di Zoologia*. 40: 201-207.

**SADOVY, I. and SHAPIRO, D.** (1987). Criteria for the diagnosis of hermaphroditism in fishes. *Copeia*. 1: 136-156.

**SAKAI, Y.** (1996). Fecundity of female angelfish, *Centropyge ferrugatus*, independent of body size: field collection of spawned eggs. *Ichthyological Research*. 43 (2): 186-189.

**SAKAI, Y. and KOHDA, M.** (1997). Harem structure of the protogynous angelfish, *Centropyge ferrugatus* (Pomacanthidae). *Environmental Biology of Fish*. 49: 333-339.

**SANWAL, R. and KANNA, S.S.** (1972). Seasonal changes in the testes of a freshwater fish *Channa gachua*. *Acta Anatomica*. 83: 139-148.

**SCHULZ, R.W., BOGERD, J. and GOOS, H.** (2000). Spermatogenesis and its endocrine regulation. Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Symposium on the Reproductive Physiology of fish. Bergen, Norway, 2000. 225-232.

**SEIGNEUR, G.N.** (1984). Eficiencia del MS222, Quinaldina y Benzocáína como anestésicos en *Rhamdia sapo* (Valenciennes, 1840). *Memorias de la Asociación Latinoamericana de Acuicultura*. 5(3): 633-639.

**SELLAMI, A. and BRUSLÉ, J.** (1975). Contribution a l'étude de la sexualité de la saupe *Boops salpa* Linnaeus 1758 (Teleosteen, Sparidae) des côtes de Tunisie. *Vie Milieu*. 25: 261-275.

**SHAPIRO, D.Y.** (1981a). Behavioral changes of protogynous sex reversal in a coral reef fish in the laboratory. *Animal Behaviour*. 29: 1185-1198.

**SHAPIRO, D.Y.** (1981c). Size, maturation and the social control of sex reversal in the coral reef fish *Anthias squamipinnis*. *Journal of Zoologist (Lond.)*. 193: 105-128.

**SHRESTHA, T.K. and KHANNA, S. S.** (1978). Histology and seasonal changes in the testes of a hill stream teleost, *Garra gotyla* (Gray). *Acta anatomica*. 100: 210-220.

**STANLEY, H.P.** (1965). Electron microscopic observations of the biflagellate spermatids of the teleost fish *Porichthys notatus*. *Anatomical Record*. 151: 477.

**STANLEY, H.P. CHIEFFI, G. and BOTTE, V.** (1965). Histological and histochemical observations on the testis of *Gobius paganellus*. *Z. Zellforsch Mikrosk Anatomy*. 65: 350-362.

**STANLEY, H.P.** (1969). An electron microscope study of spermiogenesis in the teleost fish *Oligocottus maculosus*. *Journal of Ultrastructure Research*. 27: 230-243.

**STEIN, H.** (1981). Licht- und elektronenoptische Untersuchungen an den Spermatozoen verschiedener Süsswasserknochenfische (Teleostei). *Zeitschrift für Angewandte Zoologie* 68: 183-198.

**SUGIMOTO, Y. and TAKAHASHI, H.** (1979). Ultrastructural changes of testicular interstitial cells of silver japanese eels, *Anguilla japonica*, treated with human chorionic gonadotropin. *Bulletin of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University*. 30, 23-33.

**THIAW, O.T., MATTEI, X., ROMAND, R. and MARCHAND, B.** (1986). Reinvestigation of spermatic flagella structure: the teleostean Cyprinodontidae. *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research*. 97: 109-118.

**TODD, P.R.** (1976). Ultrastructure of the spermatozoa and spermiogenesis in New Zealand freshwater eels (Anguillidae). *Cell and Tissue Research*. 171: 221-232.

**UPADHYAY, S.N. and GURAYA, S.S.** (1971). Histochemical observations on the interstitial tissue of fish testis. *General and Comparative Endocrinology*. 16: 504-510.

**VAN der HURK, R.** (1973). The localization of steroidogenesis in the testes of oviparous and viviparous teleosts. *Proceedings of the Kon. Neatherland Academy Wet.* C76: 270-279.

**VAN der HURK, R., MEEK, J. and PEUTE, J.** (1974). Ultrastructural study of the testis of the black molly (*Molliniensia latipinia*) II Sertoli cells and Leydig cells. *Proceedings Kon. Neatherland Academy Wet.* C 77, 470-476.

**VAN der HURK, R., PEUTE, J. and VERMEIJ, J.A.** (1978). Morphological and enzyme cytochemical aspects of the testis and vas deferens of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Cell and Tissue Reserach*. 186: 309-325.

**VAN DEURS, B. and LASTEIN, U.** (1973). Ultrastructure of the spermatozoa of the teleost *Pantodon buchholzi* Peters, with particular reference to the midpiece. *Journal of Ultrastructure Research* 42: 517-533.

**VOLLMANN-SCHIPPER, F.** (1978). Transporte de peces vivos. Ed. Acribia. Zaragoza - España. pp. 90.

**WARNER, R.R.** (1982). Mating systems, sex change and sexual demography in the rainbow wrasse, *Thalassoma lucasanum*. *Copeia*: 653-660.

**YAMAMOTO, H.** (1969). Sex differentiation. In: *Fish Physiology III*. W.S. Hoar and D.J. Randall (eds.). Academic Press, New York. 117-175.

**YEUNG, W.S.B., ADAL, M.N., HUI, S.W.B. and CHAN, S.T.H.** (1985). The ultrastructural and biosynthetic characteristics of steroidogenic cells in the gonad of *Monopterus albus* during natural sex reversal. *Cell and Tissue Research*. 239, 383-394.

**YOUNG, J.W., BLABER, S.J.M. and ROSE, R.** (1987). Reproductive biology of the three species of midwater fishes associated with the continental slope of eastern Tasmania, Australia. *Marine Biology*. 95: 323-332.

**ZOHAR, Y. M.; ABRAHAM, M. and GORDIN, H.** (1978). The gonadal cycle of the captivity-reared hermaphroditic teleost *Sparus aurata* (L.) during the first two years of life. *Annales de Biologie Animal, Biochimie et Biophysiques*. 18: 877-882.

## **CAPITULO II**

**BANCROFT J.D. and STEVENS A.** (1990). *Theory and Practice of Histological Technics*. J. Bancroft and A. Stevens eds. Third Edition. Churchill Livingstone. New York.

**BARA, G.** (1969). Histochemical demonstration of 3 $\beta$ -, 3 $\alpha$ -, 11 $\beta$ -, and 17 $\beta$ -hidroxysteroid dehidrogenases in the testis of *Fundulus heteroclitus*. *General and Comparative Endocrinology*. 13, 189-200.

**BILLARD, R.** (1966). Contribution à l'étude de la reproduction chez le poisson téléostéens *Lebistes reticulatus*, au moyen de l'insémination artificielle. Th. 3e cycle, Fac. Sciences, Lyon, France.

**BILLARD, R., JALABERT, B. and BRETON, B.** (1972). Les cellules de Sertoli des poissons téléostéens. I. étude ultrastructurale. *Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique*. 12, 19-32.

**BILLARD, R. and BRETON, B.** (1978). Rhythms of Reproduction in Teleost Fish. In: Thorpe JE, editor. *Rhythmic activity of Fishes*. Academic Press, London. p. 31-53.

**BILLARD, R.** (1983b). Spermiogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Cell and Tissue Research*. 233: 265-284.

- BILLARD, R.** (1986). Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reproductive and Nutrition Development*. 26 (4): 877-920.
- BILLARD, R.** (1987). The reproductive cycle of male and female brown trout (*Salmo trutta fario*): a quantitative study. *Reproduction, Nutrition and Development*. 27: 29-44.
- CALA, P.** (1976). Age at maturity testicular development and seasonal changes in the testes of the *Ide Idus idus* (L.) (Pisces, Cyprinidae) in the river Kävlingeån, South Sweden. Report of the Institute of Freshwater Research, Drottningholm, 55: 5-14.
- CALLARD, G.** (1996). Endocrinology of Leydig Cells in Nonmammalian Vertebrates. In: *The Leydig Cell*. Payne, A., Hardy, M., and Rusell, L. Eds. Cache River press. Pp. 307-332.
- CHAPMAN, D. and WOLGEMUTH, D.** (1994). Expression of proliferating cell nuclear antigen in the mouse germ like and surrounding somatic cells suggests both proliferation-dependent and -independent modes of function. *International Journal of Developmental Biology*. 38: 491-497.
- CHIEFFI, G. and BOTTE, H.** (1964). Osservazioni sul significato funzionale della geiandola annessa del testicolo dei Blennidii. *Bolletino Zoologico*. 31, 471-477.
- CINQUETTI, R.** (1994). Localization of steroidogenesis in the testis of *Padogobius martensi* (Pisces, Gobidae): Histological, histochemical and ultrastructural investigation. *Bolletino Zoologico*. 61: 309-315.
- COLOMBO, L. and BURIGHEL, P.** (1974). Fine structure of the testicular gland of the black goby, *Gobius jozo* (L.) *Cell and Tissue Research*. 154, -39-49.
- CORMACK, D.H.** (1987). Ham's Histology, ninth edition. p. 622-629. J.B. Lippincott Company, Philadelphia.
- CRAIG-BENETT, A.** (1931). The reproductive cycle of the 3 spined sticleback, *Gasterosteus aculeatus* L. *Phil. Trans Royal Society, London*. B219, 197-279.
- DORÉE, M.** (1990). Control of M-phase by maturation-promoting factor. *Currents Opinion on Cell Biol.* 2: 269-273.
- FAWCETT, D.W. and JENSH, R.P.** (1997). Bloom and Fawcett: *Conscice Histology*. p. 20. Chapman and Hall Publ., New York.
- FOLLENIUS, E. and PORTE, A.** (1960). Cytologie fine des cellules interstitielle du testicule du poisson *Lebistes reticulatus* R. *Experientia* 16, 190-192.
- FOLLENIUS, E.** (1968). Cytologie et cytophysiologie des cellules interstitielles de L'Épinoche: *Gasterosteus acculeatus* L. Etude au microscope électronique. *General and Comparative Endocrinology*. 11, 198-219.
- FOSTIER, A., JALABERT, B., BILLARD, R., BRETON, B. and ZOHAR, Y.** (1983). The gonadal steroids. In "Fish Physiology" (W.S. Hoar and D.J. Randall, eds.). Academic Press, New York. 9A: 277-372.
- GAUTIER, J., MINCHULL, J., LOIKA, M., GLOTZER, M. HUN, T. and MALLER, J. L.** (1990). Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell*. 60: 487-494.
- GENESER, F.** (2000). *Histología*. 3era Edición. Ed. Panamericana. Pp. 813.
- GODWIN, J. and THOMAS, P.** (1983). Sex change and steroid profiles in the protandrous anemonefish *Amphiprion melanopus* (Pomacentridae, Teleostei). *General Comparative and Endocrinology*. 91(2):144-57.
- GOODALL, J.A., CAPRA, M.F. and BLACKSHAW, A.W.** (1987). Quantitative histology of the seasonal changes in the gonads of summer whiting, *Sillago ciliata*. *Journal of Fish Biology*. 30: 589-595

- GRANDI, G. and BARBIERI, R.** (1987). Localization of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in *Anguilla anguilla* testis. *Basic Applied Histochemistry*. 31: 127-133.
- GRESIK, E.W., QUIRK, J.G. and HAMILTON, J.B.** (1973). A fine structural and histochemical study of the Leydig cell in the testis of the teleost, *Oryzias latipes* (Cypriniformes). *General and Comparative Endocrinology*. 20, 86-98.
- GRESIK, E. W. and HAMILTON, J. B.** (1977). Experimental sex reversal in the teleost fish, *Oryzias latipes*. In "Handbook of Sexology". Northholland Biomedical Press, Amsterdam. pp 107-126.
- GRIER, H.J.** (1981). Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *American Zoologist*. 21, -345-357.
- GRIER, H. and ABRAHAM, M.** (1983). A model for testicular recrudescence in *Oreochromis aureus*. In: Proceedings of the "International Symposium on Tilapia in Aquaculture" (L. Fishelson and Z. Yaron, eds.), Tel Aviv University Press, Tel Aviv, Israel. 200-209.
- GRIER, H., TAYLOR, R.G. and REESE, R.O.** (1987). The mechanism of tubule elongation during testicular recrudescence in the redbreast, *Scaenops ocellatus* (Perciformes). In Proceedings of the V Congress of European Ichthyologists, Stockholm 1985. Kullander S.O., Fernholm B., editors. Stockholm Swedish Museum of Natural History. 285-291.
- GRIER, H., VAN der HURK, R. and BILLARD, R.** (1989). Cytological identification of cell types in the testis of *Esox lucius* and *Esox niger*. *Cell and Tissue Research*. 257: 491-496.
- GRIER, H.** (1992). Chordate testis: the extracellular matrix hypothesis. *Journal of Experimental Zoology*. 261: 151-160.
- GRIER, H.** (1993). Comparative Organization of Sertoli Cells Including the Sertoli Cell Barrier. In: Russell L. D., Griswold MD editors. *The Sertoli cell*. Clearwater, FL: Cache River Press. 704-739.
- GRIER, H. and TAYLOR, R.** (1998). Testicular maturation and regression in the common snook. *Journal of Fish Biology*. 53: 521- 542.
- GRIER, H. J. and LO NOSTRO, F.** (2000). The germinal epithelium in fish gonads: the unifying concept. In "Reproductive Physiology of Fish, Sixth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish". Full paper. The University of Bergen, Norway. 233-236.
- GURAYA, S.S.** (1976b). Recent advances in the morphology, histochemistry, and biochemistry of steroid-synthesizing cellular sites in the testes of nonmammalian vertebrates. *Int. Review in Cytology*. 47, 99-136.
- HENDERSON, N.E.** (1962). The annual cycle in the testes of the eastern brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *Canadian Journal of Zoology*. 40, 631-641.
- HIROI, O. and YAMAMOTO, K.** (1968). Studies on the maturation of salmonid fishes. I. Changes in the testis of the chum salmon (*O. keta*), during anadromous migration. *Bulletin of the Faculty Fisheries, Hokkaido University*. 19: 173-184.
- HIROI, O. and YAMAMOTO, K.** (1970). Studies on the maturation of salmonid fishes. II. Changes in the testis of the masu salmon (*O. masou*), during anadromous migration. *Bulletin of the Faculty Fisheries, Hokkaido University*. 20: 252-264.
- HOURIGAN, T.II., NAKAMURA, M., NAGAHAMA, Y., YAMAUCHI, K. and GORDON GRAU, E.** (1991). Histology, Ultrastructure, and in Vitro Steroidogenesis of the Testes of Two Male Phenotypes of the Protogynous Fish, *Thalassoma duperrey* (Labridae). *General and Comparative Endocrinology*. 83, 193-217.
- HYDER, M.** (1970). Histological studies on the testes of pond specimens of *Tilapia nigra* and their implications of the pituitary-testis relationship. *General and Comparative Endocrinology*. 14, 198-211.

- JASPERS, E.J.M.** (1972). Some spermatological aspects of channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). Doctoral thesis. Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana, 98 p.
- JACKSON, L.F. and SULLIVAN, C.** (1995). Reproduction of white Perch: The annual gametogenic cycle. *Trans of American Fisheries Society*. 124: 563-577.
- JESSUS, C. and OZON, R.** (1993). Regulation of cell divisions during oogenesis of vertebrates: the *Xenopus* oocyte paradigm. *Comp. Biochem. Physiol.* 106 A N°3: 431-448.
- JONES, J.W. and ORTON, T.** (1940). Histological changes in the testes in the sexual cycle of the male salmon parr (*Salmo salar*). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, 12: 499-509.
- KAJIURA-KOBAYASHI, H., KOBAYASHI, T. and NAGAHAMA, Y.** (1999). Dynamics of cyclins after the initiation of spermatogenesis in a teleost, japanese eel *Anguilla japonica*. *Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. 257.
- KATSU, Y., YAMASHITA, M., KAJIURA, H. and NAGAHAMA, Y.** (1993). Behaviour of the components of maturation-promoting factor, cdc2 kinase oocyte maturation of goldfish. *Developmental Biology*. 160 (1): 99-107.
- KATSU, Y., YAMASHITA, M. and NAGAHAMA, Y.** (1999). Translational regulation of cyclin B mRNA by 17 alpha, 20 beta-dihydroxy (maturation-inducing hormone) during oocyte maturation in a teleost fish (*Carassius auratus*). *Molecular and Cell Endocrinology*. 158(1-2): 79-85.
- KOBAYASHI, H.; MINSHULL, J., FORD, C., GOLDSTEYN, R., POON, R. and HUNT, T.** (1991). On the synthesis and destruction of A and B-type cyclins during oogenesis and meiotic maturation in *Xenopus laevis*. *J. Cell Biol.* 114: 755-765.
- KOBAYASHI, T., CHANG, X., NAKAMURA, M., KAJIURA, H. and NAGAHAMA, Y.** (1996). Fish 3 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase/D5-D4 isomerase: antibody production and their use for the immunohistochemical detection of fish steroidogenic tissues. *Zoological Science*. 13: 909-914.
- KONDO, T., YANAGWA, T., YOSHIDA, N. and YAMASHITA, M.** (1997). Introduction of cyclin B induces activation of the maturation promoting factor and breakdown of germinal vesicle in growth zebrafish oocytes unresponsive to the maturation-inducing hormone. *Developmental Biology*. 190 (1): 142-152.
- KOUL, B.L.** (1974). The testes of *Glyptothorax kashmirensis* Flora, a sisorid catfish. *Zoologischer Anzeiger* 195: 253-256.
- KRISTOFFERSSON R. and PEKKARINEN, M. M.** (1975). Histological changes in the testes of brackish-water *Zoarces viviparus* (L.) in relation to the reproductive cycle. *Annales zoologici fennici* 12: 205-210.
- LAM, T.J.** (1983). Environmental influences on gonadal activity in fish. In fish physiology, vol. IX, Sohar, W., Randall, D. and Donaldson E., eds. Academic Press, New York, London. 65-116.
- LOFTS, B.** (1974). Reproduction. In *Physiology of the Amphibia*. Lofts, B. eds. New York Academic Press. Pp107-218.
- LOFTS, B.** (1984). Amphibians. In *Marshall's Physiology of Reproduction*. Lamming, G. eds. London, Churchill Livingstone. Vol. 1. Pp. 127-205.
- LOFTS, B.** (1987). Testicular Function. In: Norris NO, Jones RE, editors. *Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians and Reptiles*. New York Plenum Press. p. 283-325.
- LOFTS, B. and MARSHALL, A.J.** (1957). Cyclical changes in the distribution of the testis lipids of a teleost fish, *Esox lucius*. *Quarterly Journal of Microscopy Sciences*. 98: 79-98.

- LOHKA, M.J.; HAYES, M. K. and MALLER, J. L.** (1988) Purification of natural promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 85: 3009-3013.
- MACER, C.T.** (1974). The reproductive biology of the horse mackerel *Trachurus trachurus* (L) in the North Sea and English Channel. Journal of Fish Biology 6: 415-438.
- MACKAY, N.J.** (1972). The reproductive cycle of the firetail gudgeon *Hypseleotris galii*. II. Seasonal histological changes in the testis. Australian Journal of Zoology 21: 67-74.
- MASSUI, Y. and MARKET, C. L.** (1971) Cytoplasmatic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. J. Exp. Zool. 177: 129-146.
- MOYSEYEVA, B. Y. and PONOMAREVA, V.P.** (1973). Histophysiological characteristics of the testes and seminal vesicles of the "Round Goby", *Gobius malanostomus*, in different stages of the sexual cycle. Journal of Ichthyology. 13,368-381.
- NAGAHAMA, Y.Y., CLARKE, W.C. and HOAR, W.S.** (1978). Ultrastructure of putative steroid-producing cells in the gonads of coho, *Oncorhynchus kisutch* and pink salmon, *O. gorbuscha*. Canadian Journal of Zoology. 56, 2508-2519.
- NAGAHAMA, Y.; KAGAWA, H. and YOUNG, G.** (1982). Cellular sources of sex steroids in teleost gonads. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 39, 56-64.
- NAGAHAMA, Y.** (1983). The functional morphology of teleost gonads. In: Hoar W, Randall DJ, Donaldson EM. Fish Physiology. Academic Press. Vol. 9, Part A p. 433. Part B p. 477.
- NAGAHAMA, Y.** (2000). Gonadal steroid hormones: major regulators of gonadal sex differentiation and gametogenesis in fish. In "Reproductive Physiology of Fish, Sixth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish". Full paper. The University of Bergen, Norway. 211-222.
- NICHOLLS, T.J. and GRAHAM, G.P.** (1972). The ultrastructure of lobule boundary cells and Leydig cell homologs in the testis of a cichlid fish, *Cichlasoma nigrofasciatum*. General and Comparative Endocrinology. 19, 133-146.
- NTIBA, M.J. and JACCARINI, V.** (1990). Gonad maturation and spawning times of *Siganus sutor* off the Kenya coast: evidence for definite spawning seasons in a tropical fish. Journal of Fish Biology. 37: 315-325.
- NURSE, P.** (1990) Universal control of mechanism regulating onset of M-phase. Nature (London) 344: 503-508.
- OKADA, M., SAKAGUCHI, T. and KAWASAKI, K.** (1996). Proliferating cell nuclear antigen in neurones: induction by u.v. irradiation. Neurochemistry. Vol. 7, No. 11. 1770-1772.
- OTA, I. and YAMAMOTO, K.** (1966). Interstitial cells in the immature testes of the rainbow trout. Annot. Zool. Jpn. 39, 142-148.
- ORTEGO, L.S., HAWKINS, W.E., WALKER, W.W., KROL, R.M. and BENSON, W.H.** (1994). Detection of proliferating cell nuclear antigen in tissues of the three small fish species. Biotechnic and Histochemistry. 69: 6.
- OSBORNE, R., MELO, Y. and HOFMEYER, M.** (2000). Spawning dynamics of cape hakes, *Merluccius capensis* and *M. paradoxus*. In "Reproductive Physiology of Fish, Sixth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish". Full paper. The University of Bergen, Norway. 113.
- PAPADOPOL, M.** (1962). Nouvelles données concernant la biologie de la reproduction de la brème (*Abramis brama* L.) du cours inférieur de Danube (en romain). Studii cercet. Biologie. 14: 393-400.
- PAYNE, A. I.** (1975). The reproductive cycle, condition and feeding in *Barbus liberiensis*, a tropical stream dwelling cyprinid. Journal of Zoology. 176: 247-269.

- PETERS, H. M.** (1971). Testis weights in *Tilapia* (Pisces: Cichlidae). *Copeia*. 1: 13-17.
- PORTIANSKY, E.L. and GIMENO, E.J.** (1996). A new Epitope Retrieval Method for Detection of Structural Cytokeratines in the Bovine Prostatic Tissue. *Applied Immunohistochemistry*. 4: 208-214.
- PUDNEY, J.** (1998). Leydig and Sertoli Cells, Nonmammalian. *Encyclopedia of Reproduction*. Vol. 2. Eds. Knobil, E. and Neill, J. pp1008- 1021.
- RAI, B.P.** (1965). Cyclic changes in the testes of the mahaseer, *Barbus tor* (Tor tor). *Acta Anatomica*. 62: 461-475.
- RICE, C. D. and BURTON, M. P.** (2000). Histological evidence supporting the two critical period model of sexual maturity in male salmonids. In "Reproductive Physiology of Fish, Sixth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish". Full paper. The University of Bergen, Norway. 253.
- ROBERTS, S. B, JACKSON, L. F., KING, W., TAYLOR, R. G., GRIER, H. J. and SULLIVAN, C. V.** (1999). The annual reproductive cycle of the common snook: endocrine correlates of maturation. *Trans American Fisheries Society*. 128: 436-445.
- RUBY S.M. and MILLAN, D.** (1970). Cyclical changes in the testes of the brook stickleback, *Eucalia inconstans*. *Journal of Morphology*. 131: 465-477.
- SCOTT, A.P. and SUMPTER, J.P.** (1989). Seasonal variations in testicular germ cell stages and in plasma concentrations of sex steroids in male rainbow trout (*Salmo gairdneri*) maturing at 2 years old. *General and Comparative Endocrinology*. 73: 46-58.
- SHI S.R., KEY M.E. and KAIRA K.L.** (1993). Antigen Retrieval in Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissues: An Enhancement Method for Immunohistochemical Staining Based on Microwave Oven Heating of Tissue sections. *Journal Histochemistry and Cytochemistry*. 41: 1599-1604.
- SHIKHSHABEKOV, M.M.** (1972). The annual cycle of the gonads in wild carp (*Cyprinus carpio* (L.) from Terek Delta. *Journal of Ichthyology*. 12: 855-859.
- SHIKHSHABEKOV, M.M.** (1976). Annual cycle of ovaries and testes in the tench, *Tinca tinca* in the waters of Dagestan. *Journal of Ichthyology*. 16: 685-689.
- SHIKHSHABEKOV, M.M.** (1978). The sexual cycles of the catfish, *Silurus glanis*, the pike, *Esox lucius*, the perch, *Perca fluviatilis*, and the pike-perch, *Lucioperca lucioperca*. *Journal of Ichthyology*. 18: 457-468.
- SHRESTHA, T.K. and KHANNA, S.S.** (1976). Histology and seasonal changes in the testes of a hill stream fish *Schizothorax plagiostomus*. *Zeitschrift für mikroskopisch-anatomische Forschung* (Leipzig). 90: 749-761.
- SHRESTHA, T.K. and KHANNA, S.S.** (1976). Histology and seasonal changes in the testes of a hill stream teleost, *Garra gotyla* (Gray). *Acta Anatomica* 100: 210-220.
- SMITH, L. D. and ECKERT, R. E.** (1971). Regulatory processes in the maturation and early cleavage of amphibian eggs. *Currents. Topics on Developmental Biology*. 5: 1-38.
- SMITH, C.L. and YOUNG, P.H.** (1966). Gonad structure and the reproduction cycle of kelp bass, *Paralabrax clathratus* (Girard), with comments on the relationships of the serranid genus *Paralabrax*. *California Fish and Gametes*. 52: 283-292.
- STANLEY, H.P. CHIEFFI, G. and BOTTE, V.** (1965). Histological and histochemical observations on the testis of *Gobius paganellus*. *Z. Zellforsch Mikrosk Anatomy*. 65: 350-362.
- SUGIMOTO, Y. and TAKAHASHI, H.** (1979). Ultrastructural changes of testicular interstitial cells of silver Japanese eels, *Anguilla japonica*, treated with human chorionic gonadotropin. *Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.* 30, 23-33.
- TAKAHASHI, H. and IWASAKI, Y.** (1973a). The occurrence of histochemical activity of 3 $\beta$ -HSD in the developing testis of *Poecilia reticulata*. *Developmental and Growth Differentiation*. 15, 241-253.

- TAKAHASHI, H. and IWASAKI, Y.** (1973b). Histochemical demonstration of 3 $\beta$ -HSD activity in the testis of the medaka, *Oryzias latipes*. *Endocrinology Jpn.* 20, 529-534.
- TANG, F., LOFTS, B. and CHAN, S.T.H.** (1975). A study on 3 $\beta$ -HSD activity in the gonads of *Monopterus albus* at various sexual phases during natural sex reversal. *Journal of Zoology.* 175, 571-580.
- TAYLOR, R.G., GRIER, H. and WHITTINGTON, J.A.** (1998). Spawning rhythms of common snook in Florida. *Journal of Fish Biology.* 53: 502-520.
- TERRATS; A. and PETRAKIS, G.** (2000). Gonadosomatic and hepatosomatic index fluctuations of two deep-water fish species in the eastern ionian sea. In "Reproductive Physiology of Fish, Sixth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish". Full paper. The University of Bergen, Norway. p. 114.
- TROYER, H.** (1980). Principles and techniques of histochemistry. pp. 655.
- VAN der HURK, R.** (1973). The localization of steroidogenesis in the testes of oviparous and viviparous teleosts. *Proceedings of the Nederland Akademie Van Wetenschappen, Amsterdam. Serie C,* 76, No. 3. 270-279.
- VAN der HURK, R., MEEK, J. and PEUTE, J.** (1974). Ultrastructural study of the testis of the black molly (*Molliniensia latipinina*) II Sertoli cells and Leydig cells. *Proceedings kon. Ned. Akad. Wet., Ser C* 77, 470-476.
- VAN der HURK, R., PEUTE, J. and VERMEIJ, J.A.** (1978). Morphological and enzyme cytochemical aspects of the testis and vas deferens of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Cell and Tissue Research.* 186: 309-325.
- VIZZIANO, D.** (1995). Curso Pedeciba: "Endocrinología de la reproducción en peces teleósteos". Guía de Trabajos Prácticos. Universidad de la República Oriental de Uruguay, Facultad de Ciencias y Oceanografía. Montevideo, Uruguay.
- WARWICK, R. and WILLIAMS, P.L.** (1973). *Gray's Anatomy*, 35<sup>th</sup> British Edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- WEIL, C.** (1981). La fonction gonadotrope de l'hypophyse au cours de cycle sexuel chez deux poissons téléostéens: la carpe commune (*Cyprinus carpio*), et la truite arc en ciel (*Salmo gairdneri*), son contrôle par l'hypothalamus, les gonades et les facteurs externes. Th. Doc. Etat, Univ. Paris VI.
- WESTERNDORF, J.M., SWENSON, K. I. and RUDERMAN, J. V.** (1989). The role of cyclin B in meiosis. *Journal of Cell Biology.* 108:1431-1444.
- WIEBE, J. P.** (1969). Steroid dehydrogenases and steroids in gonads of the seaperch (*Cymatogaster aggregata*). *General and Comparative Endocrinology.* 12, 256-266.
- WHEATER, P.R. and BURKITT, H.G.** 1987. *Functional Histology, A Text and Color Atlas.* Churchill Livingstone, New York, New York.
- YAMAZAKI, F. and DONALDSON, E.M.** (1969). Involvement of gonadotropin and steroid hormones in the spermiation of the goldfish *Carassius auratus*. *General and Comparative Endocrinology.* 12: 491-497.
- YARON, Z.** (1966). Demonstration of 3 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase in the testis of *Tilapia mossambica*. *Journal of Endocrinology.* 34: 127-128.
- YEUNG, W. S. B., ADAL, M. N., HUI, S. W. B. and CHAN, S. T. H.** (1985). The ultrastructural and biosynthetic characteristics of steroidogenic cells in the gonad of *Monopterus albus* during natural sex reversal. *Cell and Tissue Research.* 239, 383-394.

### **CAPITULO III**

- AMANO, J.P., AIDA, K., OKUMOTO, N., and HASEGAWA, Y.** (1986). Changes in salmon GnRH and chicken GnRH-II contents in the brain and pituitary, and GTH contents in the ovulation. *Zoological Science.* 9:375-386.

- BLÁZQUEZ, M., P.T. BOSMA, E.J. FRASER, K.J.W. VAN LOOK and V.L. TRUDEAU.** (1998). Fish as models for the neuroendocrine regulation of reproduction and growth. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C* 119: 345-364.
- BILLARD, R.** (1976). Induction of sperm release in the goldfish by some steroids. *IRCS Med. Sci. Libr. Compend.* 4: 42.
- BILLARD, R.** (1989). Endocrinology and fish culture. *Fish Physiology and Biochemistry.* 7: 49-58.
- BOGERD, J., ZANDBERGEN, T., ANDERSSON, E. and GOOS, H.** (1994). Isolation, characterization and expression of cDNA encoding the catfish-type and chicken-II-type gonadotropin-releasing hormone precursors in the *African catfish*. *European Journal of Biochemistry.* 222:541-549.
- BRETON, B.; WEIL,C.; SAMBRONI, E. and ZOHAR, Y.** (1990). Effects of acute versus sustained administration of GnRH $\alpha$  on GtH release and ovulation in the rainbow trout, *Onchorynchus mykiss*. 91: 373-383.
- BRETON, B., M. GOVOROUN and T. MIKOLOJCZYK.** (1998). GtH-I and GtH-II secretion profiles during the reproductive cycle in female rainbow trout: relationship with pituitary responsiveness to GnRH-A stimulation. *General and Comparative Endocrinology.* 111:38-50.
- BURGUS, R., BUTCHER, M., AMOSS, M., LING, N., MONAHAN, M., RIVIER, J., FELLOWS, R., BLACKWELL, R., VALE, W., and GUILLEMIN, R.** (1972). Primary structure of ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF). *Proceedings of The National Academy of Science (U.S.A).* 69:278-282.
- CAROLSFELD, J., SHERWOOD, N., KREIBERG, H. and SOWER, S.** (1988) Induced sexual maturation of herring using GnRH quick-release cholesterol pellets. *Aquaculture,* 70: 169-181.
- CAROLSFELD, J.; J.F.F. POWELL; M. PARK; W.H. FISCHER; A.G. CRAIG; J.P.CHANG; J.E. RIVIER and N.M. SHERWOOD.** (2000). Primary structure and function of three GnRH, including a novel form from an ancient teleost, herring. *Endocrinology.* 141: 505-512. 2000
- CONLON, J.M., COLLIN, F., CHIANG, Y. C., SOWER, S.A., and VAUDRY, H.** (1993). Two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone from the brain of the frog, *Rana ridibunda*: Purification, characterization, and distribution. *Endocrinology* 132:2117-2120.
- CHAN, S. T.; WAI-SUM O.; TANG F., and LOFTS B.** (1972). Biopsy studies on the natural sex reversal in *Monopterus albus* (Pisces: Teleostei). *Journal of Zoology,* London. 167, 415-421.
- CHANG, S.T.H., WAI-SUM, O. and HUI, S. W. B.** (1975). The gonadal and adenohipophysial functions of natural sex reversal. in *Intersexuality in the Animal Kingdom.* Reinboth, R. ed.), pp. 201-221. Berlin: Springer Verlag.
- 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. and YEUNG, N.** (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.
- CHEN, A.; YAHALOM, D.; BEN-AROYA, N.; KAGANOVSKY, E.; OKON, E. and KOCH, Y.** (1998). A second isoform of gonadotropin-releasing hormone is present in the brain of human and rodents. *FEBS Letters.* 435: 199-203.
- CHIEFFI, G., PIERANTONI, R. and FASANO, S.** (1991). Immunoreactive GnRH in hypothalamic and extrahypothalamic areas. *International Review in Cytology.* 127:1-55.

**CRIM, L.W. and B.D. GLEBE.** (1990). Reproduction In Schreck, C.B. and P.B. Moyle, (eds.) Methods for fish Biology. American Fisheries Society, Bethesda; MD USA pp529-553.

**D'ANTONIO, M.; VALLARINO, M.; LOVEJOY, D. A.; VANDENSADE, J.A.; KING, J.A.; PIENATORI, R. and PETER, R.E.** (1995). Nature and distribution of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) in the brain, and GnRH and GnRH binding activity in serum of the spotted dogfish *Scyliorhinus canicula*. General and Comparative Endocrinology. 98:35-49.

**DELLOVADE, T.L., KING, J.A., MILLAR, R.P. and RISSMAN, E.F.** (1993). Presence and differential distribution of distinct forms of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone in the musk shrew brain. Neuroendocrinology 58:166-177.

**DONALDSON, E.M. and HUNTER, G.A.** (1983) Induced final maturation, ovulation and spermiation in cultured fish. Pp 351-403 in Hoar, W.S., D.J. Randall and E.M. Donaldson (eds.) Fish Physiology vol. 9B. Academic Press, New York.

**DONALDSON, E.M.** (1996). Manipulation of reproduction in farmed fish. Animal Reprod. Scie. 42: 381-392.

**DUFOUR, S., MONTERO M., LE BELLE, N., BASSONPIERRE M., KING J.A., MILLAR R.P., PETER, R.E. and FONTAINE Y.A.** (1993). Differential distribution and response to experimental sexual maturation of two forms of brain gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in th European eel, *Anguilla anguilla*. Fish Physiology and Biochemistry. 11:99-106.

**FRADINGER, E.A., VON SCHALBURG, K. and SHERWOOD, N.** (2000). An evolutionary perspective on GnRH in fish. In "Reproductive Physiology of Fish, Sixth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish". Full paper. The University of Bergen, Norway. 35-38.

**GAUTRON, J.P., PATTOU, E., BAUER, K., and KORDON, C.** (1991). (Hydroxiprolin<sup>9</sup>) luteinizing hormone-releasing hormone: a novel peptide in mammalian and frog hypothalamus. Neurochemistry. 18:221-235.

**GOTHILF, Y., CHEN, T.T. and ZOHAR, Y.** (1993). Gonadotropin-releasing hormone gene(s) in stripped bass. Program Symposium on Advances in the Molecular Endocrinology of Fish, May 23-25, Toronto, Canada.

**GOTHILF, Y.; ELIZUR, A. and ZOHAR, Y.** (1995). Three forms of gonadotropin-releasing hormone in the gilthead seabream and stripped bass: Physiological and molecular studies. En: Vth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish". Goetz, F. and Thomas, P eds. The University of Texas at Austin, Marine Science Institute, Texas, USA.

**GLUBOKOV, A.I., MOTLOCH, N.N. and SEDOVA, M.A..** (1991). Effect of a synthetic LHRH analog and dopamine antagonist on the maturation of bream *Abramis brama*. Aquaculture, 95: 373-377.

**GROBER, M.S., BASS, A. and MAYERS, D.** (1992). GnRH cDNA sequence for the sexually polymorphic teleost fish, *Trichthys nonatus*. Abs. Soc. Neuroscience. 18: 894.

**GROBER, M. S., MYERS, T. R., MARCHATERRE, M.A., BASS, A.H., and MYERS D.A.** (1995). Structure, localization, and molecular phylogeny of a GnRH cDNA from a Paracanthopterygian fish, the plainfish midshipman (*Porichthys nonatus*). General Comparative Endocrinology. 99: 85-99.

**GROBER, M.S., and SUNOBE, T.** (1996) Serial adult sex change involves rapid and irreversible changes in forebrain neurochemistry. Neuroreport, 7: 2945-9.

**GUIGUEN Y; B. JALABERT and FOSTIER, A.** (1993). Changes in plasma and gonadal steroid hormones in relation to the reproductive cycle and sex inversion process in

- the protandrous seabass, *Lates calcarifer*. *General and Comparative Endocrinology*. 92: 327-338.
- HABIBI, H.R., PETER, R., NAHORNIAK, C., MILTON, R. and MILLAR, R.** (1992). Activity of vertebrate gonadotropin-releasing hormones and analogs variant amino acid residues in positions 5, 7, 8 in the goldfish pituitary. *Regulatory Peptides*. 37: 271-284.
- HABIBI, H.R. and PATI, D.** (1993b). Extrapituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) binding sites in goldfish. *Fish Physiology and Biochemistry*. 11:43-49.
- HABIBI, H.R., PATI, D., OUWENS, M. and GOOS, H.J.T.** (1994). Presence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) binding sites and compounds with GnRH-like activity in the ovary of African catfish, *Clarias gariepinus*. *Biology of Reproduction*. 50:643-652.
- JIMENEZ-LIÑAN, M., RUBIN, B. S. and KING, J. C.** (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.
- JOSS, J.M.P., KING, J.A. and MILLAR, R.P.** (1994). Identification of the molecular forms of an steroid hormone response to gonadotropin-releasing hormone in the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. *General and Comparative Endocrinology*. 96:392-400.
- KAH O., I. ANGLADE, E. LEPRETRE, P. DUBOURG and MONBRISON, D.** (1993). The reproductive brain in fishes. *Fish Physiology and Biochemistry*. Vol 11 n°1-6: 85-98.
- KAHN, I.A. and THOMAS, P.** (1993). Immunocytochemical localization of serotonin and gonadotropin-releasing hormone in the brain and pituitary gland of the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *General and Comparative Endocrinology*. 91:167-180.
- KAKISAWA, S., KANEKO, T. and HIRANO, T.** (1997). Effects of hypothalamic factors on somatolactin secretion from the organ-cultured pituitary of rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*. 105, 71-78.
- KASTEN, T.L., WHITE, S.A., NORTON, T.T., BOND, C.T., ADELMAN, J.P. and FERNALD, R.D.** (1996). Characterization of two new preproGnRH mRNAs in the tree shrew: First direct evidence for mesencephalic GnRH gene expression in a placental mammal. *General and Comparative Endocrinology*. 104:7-19.
- KAWAUCHI, H.** (1994). The special neurosecretory system in the brain and pituitary gland. *Perspective on Comparative Endocrinology*. pp 20-23.
- KELSALL, R.; COE, I.R. and SHERWOOD, N.M.** (1990). Phylogeny and ontogeny of gonadotropin releasing hormone: comparison of guinea pig, rat, and a protochordate. *General and Comparative Endocrinology* 78: 479-494.
- KING, J.A. and MILLAR, R.P.** (1982a). Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone I. Structural determination on partially purified material. *Journal of Biology and Biochemistry*. 257:10722-10728.
- KING, J.A. and MILLAR, R.P.** (1982b). Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone II. Isolation and characterization. *Journal of Biology and Biochemistry*. 257:10729-10728.
- KING, J.A. and MILLAR, R.P.** (1985). Multiple molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in teleost fish brain. *Peptides*. 6: 689-694.
- KING, J.A. and MILLAR, R.P.** (1986). Identification of His<sup>5</sup>, Trp<sup>7</sup>, Tyr<sup>8</sup>-GnRH (chicken GnRH II) in amphibian brain. *Peptides* 7: 827-834.
- KING, J.A.; HASSAN, M.F.; MEHL, A.E.I. and MILLAR, R.P.** (1988). Gonadotropin-releasing hormone molecular forms in mammalian hypothalamus. *Endocrinology* 122: 2742-2752.

**KING, J.A., MEIL, A.E.I., TYNDALE-BISCOE, C.II., HINDS, L.A. and MILLAR, R.P.** (1989). A second form of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), with chicken II-like properties, occurs together with mammalian GnRH in marsupial brains. *Endocrinology*. 125:2244-2252.

**KING, J.A., HINDS, L.A., MEHL, A.E.I., SAUNDERS, N.R. and MILLAR, R.P.** (1990a). Chicken GnRH II occurs together with mammalian GnRH in South American species of marsupial (*Monodelphis domestica*). *Peptides* 11:521-525.

**KING, J.A., DUFOUR, S., FONTAINE, Y.A. and MILLAR, R.P.** (1990b). Chromatographic and immunological evidence for mammalian GnRH and cII GnRH in eel (*Anguilla anguilla*) brain and pituitary. *Peptides*, 11:507-514.

**KING, J.A.; STENEVELD, A.A.; MILLAR, R.P.; FASENO, S.; ROMANO, G.; SPAGNUOLO, A.; ZANETTI, L. and PIERANTONI, R.** (1992). Gonadotropin-releasing hormone in elasmobranch (electric ray, *Torpedo marmorata*) brain and plasma: chromatographic and immunological evidence for chicken GnRH-II and novel molecular forms. *Peptides* 13:27-35.

**KING, J.A., STENEVELD, A.A., CURLEWIS, J.D., RISSMAN, E.F., and MILLAR, R.P.** (1994). Identification of Chicken GnRH II in brains of metatherian and early-evolved eutherian species of mammals. *Regulatory Peptides* 54:467-477.

**KING, J.A. and MILLAR, R.P.** Vallarino, M., and Pienaroti, R. (1995a). Localization and characterization of gonadotropin-releasing hormones in brain, gonads, and plasma of a dipnoi (lungfish, *Protopterus annectens*). *Regulatory Peptides*. 57:163-174.

**KING, J.A. and MILLAR, R.P.** (1995b). Evolutionary aspects of gonadotropin-releasing hormone and its receptor. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 15:5-23.

**KING, J.A. & MILLAR, R.P.** (1997). Coordinated evolution of GnRHs and their receptors. In: *GnRH Neurons. Gene to behavior*. Eds. Parhar, I.S. and Sakuma, Y., Brain Shupan, Tokyo, pp. 51-78.

**KOULISH, S. and KRAMER, C.** (1989 a). hCG induces sex reversal in *Thalassoma bifasciatum*, a protogynous fish. *J. Oc Cell Biology*. 107: 483<sup>a</sup>.

**KOULISH, S. and KRAMER, C.** (1989 b). Human chorionic gonadotropin (hCG) induces gonad reversal in a protogynous fish, the bluehead wrasse, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei, Labridae). *Journal of Experimental Zoology* 252: 156-168.

**KRAMER, C.L., M.T. CADDELL and BUBENHEIMER-LIVOLSI, L.** (1993). sGnRH-A [(D-Arg<sub>6</sub>, Pro<sub>9</sub>, Net-) LHRH] in combination with domperidone induces gonad reversal in a protogynous fish, the bluehead wrasse, *Thalassoma bifasciatum*. *Journal of Fish Biology* 42: 185-195.

**KREIBERG H.; G. HUNTER; E. DONALDSON; W. CLARKE and BAKER, I.** (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.

**LE GAC, F., BLAISE O., FOSTIER A., LE BAIL P.Y., LOIR M., MOUROT B. and WEIL C.** (1993). Growth hormone (GH) and reproduction: a review. *Fish Physiology and Biochemistry* 11:219-232.

**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.

**LEPRETE, E. ANGLADE, P. WILLIOT, F., VANDESANDE, G., TRAMU G. and KAH, O.** (1993). Comparative distribution of mammalian GnRH (Gonadotropin-releasing hormone) and chicken GnRH-II in the brain of the immature Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *Journal of Comparative Neurology*. 337: 568-583.

**LESCHEID, D. W.; TERASAWA, E.; ABLER, L.A.; URBANSKI, H.F.; WARBY, C.M.; MILLAR, R.P. and SHERWOOD, N.M.** (1997) A second form of gonadotropin releasing hormone (GnRH) with characteristics of chicken GnRH-II is present in the primate brain. *Endocrinology* 138: 5618-5629.

**LIEM, K.F.**(1968). Geographical and taxonomic variation in the pattern of natural sex reversal in the teleost fish order Synbranchiformes. *Journal of Zoology Lond.* 156: 225-238.

**LINARD, B., BENNANI, S. and SALIGAUT, C.** (1995) Involvement of estradiol in a catecholamine inhibitory tone of gonadotropin release in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology.* 114: 341-347.

**LIN, X.W., H.R. LIN and R.E. PETER.** (1993). Growth hormone and gonadotropin secretion in the common carp (*Cyprinus carpio* L.): in vitro interactions of gonadotropin-releasing hormone, somatostatin, and the dopamine agonist apomorphine. *Gen. Comp. Endocrinol.* 89: 62-71.

**LIN, X.W., LIN, H.R. and PETER, R.E.** (1996). Expression of salmon gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and chicken GnRH-II precursor messenger ribonucleic acids in the brain and ovary of goldfish. *General and Comparative Endocrinology.* 101:282-296.

**LO NOSTRO, F.L., RAVAGLIA, M., MAGGESE, M.C.; GUERRERO, G. AND G. SOMOZA.** (1996). "Characterization of molecular variants of GnRH in the brain of protogynous "swamp eel", *Synbranchus marmoratus*". *Reproductive Physiology of Fish; Vth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*". Goetz, F. and Thomas, P eds. The University of Texas at Austin, Marine Science Institute, TX, USA., p.74, 1995.

**LOVEJOY, D.A., SHERWOOD, N.M., FISCHER, W.H., JACKSON, B.C., RIVIER, J., and LEE, T.** (1991a). Primary structure of gonadotropin-releasing hormone from the brain of the holocephalan (ratfish: *Hydrogalus colliei*). *General and Comparative Endocrinology.* 82:152-161.

**LOVEJOY, D.A., FISCHER, W.H., NGAMVONGCHON S, CRAIG, A.G., NAHORNIAK, C.S., PETER, R.E., RIVIER, J.E. and SHERWOOD, N.M.** (1992a). Distinct sequence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in dogfish brain provides insight into GnRH evolution. *Proceedings of the Natural Academy of Science (U.S.A).* 89:6373-6377.

**LOVEJOY, D.A.; STELL, W.K. and SHERWOOD, N.M.** (1992b). Partial characterization of four forms of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone in the brain and terminal nerve of spiny dogfish (Elasmobranchii; *Squalus acanthias*). *Regulatory Peptides.* 37: 39-48.

**LOVEJOY, D.A., KING, J.A., SHERWOOD, N.M. and PETER, R.E.** (1993). Identification of gonadotropin-releasing hormone and associated binding substances in the blood serum of an holocephalan (*Hydrogalus colliei*). *Peptides* 14:1237-1243.

**MARCHANT, T.A. and PETER, R.E.** (1989). Hypothalamic peptides influencing growth hormone secretion in the goldfish, *Carassius auratus*. *Fish Physiology and Biochemistry.* 7:133-139.

**MARCHANT, T.A., CHANG, J.P., NAHORNIAK, C.S., and PETER, R.E.** (1989b). Evidence that gonadotropin-releasing hormone also functions as a growth hormone-releasing factor in the golfish. *Endocrinology.* 124:2509-2518.

**MATSUO, H., BABA, Y., NAIR, R.M.G., ARIMURA, A. and SCHALLY, A.V.** (1971). Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochemistry and Biophysics, Res. Commun.* 43:1334-1339.

**MELAMED, P., ELIAHU, N., LEVAVI-SIVAN, B., OFIR, M., FARCHI-PISANTY, O., RENTEIER-DELRUBE, F., SMAL, J., YARON, Z., and NAOR, Z.** (1995). Hypotalamic and thyroidal regulation of growth hormone in tilapia. *General and Comparative Endocrinology*. 64: 396-400.

**MIKAMI, S.I., YAMADA, S., HASEGAWA Y. and MIYAMOTO K.** (1988). Localization of avian LHRH immunoreactive neurons in the hypothalamus of the domestic fowl, *Gallus domesticus*, and the Japanese quail, *Coturnix coturnix*. *Cell and Tissue Research*. 251:51-58.

**MILOMAS C., HINSHAW, J. and SULLIVAN, C. V.** (1992). GnRHa-induced ovulation of brown trout (*Salmo trutta*) and its effects on eggs quality. *Aquaculture*, 106: 379-392.

**MILLAN, J.R., FARIS, O.M. and YOUNGREN, M.E.** (1993). Immunohistochemical localization of chicken gonadotropin-releasing hormones I and II (cGnRH I and II) in turkey brain. *Journal of Comparative Neurology*. 33:63-82.

**MIRANDA, L.A., PAZ, D.A., AFFANNI, J.M. and SOMOZA, G.M.** (1998). Identification and neuroanatomical distribution of immunoreactivity for mammalian gonadotropin-releasing hormone (mGnRH) in the brain and neural hypophyseal lobe of the toad *Bufo arenarum*. *Cell and Tissue Research*. 293: 419-425.

**MIRANDA, L.A.; MONTANER, A.D.; ANSALDO, M.; AFFANNI, J.M. and SOMOZA, G.M.** (1999). Characterization of brain gonadotropin-releasing hormone (GnRH) molecular variants in brain extracts from different Perciform fishes from Antarctic waters. *Polar Biology*. 21:122-127.

**MIURA; T., YAMAUCHI, K., NAGAHAMA. Y. and TAKAHASHI, H.** (1991). Induction of spermatogenesis in male japanese eel, *Anguila japonica*, by a single injection of human chorionic gonadotropin. *Zoological Science*. 8: 63-73.

**MIYAMOTO K., HAGESAWA Y., NOMURA M., IGARASCHI M., KANGAWA K. and MATSUO H.** (1984). Identification of the second gonadotropin releasing hormone in the chicken hypothalamic: evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. *Proceedings of the National Academy Science(U.S.A.)*. 81:3874-3878.

**MONTANER, A.D.; SOMOZA, G.M.; KING, J.A.; BIANCHINI, J.J.; BOLIS, G. and AFFANNI, J.M.** (1998). Chromatographic and immunological identification of GnRH (Gonadotropin-releasing hormone) variants. Occurrence of mammalian and salmon-like GnRH in the forebrain of an eutherian mammal: *Hydrocaeris hydrocaerys* (Mammalian, Rodentia). *Regulatory Peptides*. 73:197-204.

**MONTANER, A., PARK, M., FISCHER, W., CRAIG, A., CHANG, J., SOMOZA, G., RIVIER, J. and SHERWOOD, N.** (2000). Identification of a new GnRH form in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. 4<sup>th</sup> International Symposium on Fish Endocrinology. Seattle, USA. August, 2000.

**MUSKE, L.E. AND MOORE, F.L.** (1994). Antibodies against different forms of GnRH define different cells and axonal pathways in a urodele amphibian, *Taricha granulosa*. *Journal of Comparative Neurology*. 345:139-147.

**MUSKE, L.E.** (1997) Ontogeny, phylogeny and neuroanatomical organization of multiple molecular forms of GnRH. In: *GnRH neuros: Gene to Behaviour*. Eds. Parhar I.S. and Sakuma Y. Brain Shuppan, Tokyo, Japan. pp. 145-180.

**NAGAHAMA, Y.** (2000). Gonadal steroid hormones: major regulators of gonadal sex differentiation and gametogenesis in fish. *Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Symposium on the Reproductive Physiology of fish*. Norberg, B; Kjesbu, O.S.; Taranger, G.L.; Andersson, E.; y Stefansson, S.O. Eds. Pp. 211-222.

**NGAMVONGCHON, S., LOVEJOY, D., FISCHER, W., CRAIG, A., NAHORNIAK, C., PETER, R., RIVIER, J. and SHERWOOD, N. M.** (1992a). Primary structure of the two forms of gonadotropin-releasing hormone, one distinct and one conserved, from catfish brain. *Brain Molecular and Cellular Neurosciences* 3:17-22.

**NORTHCUTT, R.G.; and MUSKE, L.E.** (1994). Multiple embryonic origins of gonadotropins releasing hormone (GnRH) immunoreactive hormones. *Developmental Brain Research*. 78: 279-290.

**NOSAKI, M., NAITO, N., SWAMPSON, P., MIYATA, R., NAKAI, Y., OOTA, Y., SUZUKI, K., SAKAYAMA, T. and KAWAUCHI, H.** (1990). Salmonid pituitary gonadotrophs. I: Distinct cellular distribution of the two gonadotropins, GTH I and GTH II. *General and Comparative Endocrinology*. 77: 348-357.

**OKUBO, K., AMANO, M., YOSHIURA, Y., SUETAKE, H. and AIDA, K.** (2000). A novel form of gonadotropin-releasing hormone in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochemistry, Biophysics Research Commun.* 276: 298-303.

**OKUSAWA, K., AMANO, M., KOBAYASHI, M., AIDA, K., HANYU, I., HASEGAWA, Y. and MIYAMOTO, K.** (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. *General and Comparative Endocrinology*. 80:116-126.

**QUERAT, B.** (1995). Molecular evolution of the glycoprotein hormones in vertebrates. In Davey, K. B., R.E. Peter and S.S. Tobe editors. *Perspectives in Comparative Endocrinology*. Ottawa: National Research Council of Canada. 27-37.

**PATI, D. and HABIBI, H.R.** (1992). Characterization of gonadotropin-releasing hormone receptors in the ovary of common carp (*Cyprinus carpio*). *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 70:268-272.

**PATI, D. and HABIBI, H.R.** (1993a). Characterization of gonadotropin-releasing hormone receptors in goldfish ovary: Variation during follicular development. *American Journal of Physiology*. 264: 227-234.

**PATI, D. and HABIBI, H.R.** (1993b). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) binding characteristics in the testis of goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Experimental Biology*. 267:155-163.

**PATI, D. and HABIBI, H.R.** (1998). Presence of salmon gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and compounds with GnRH-like activity in the ovary of goldfish. *Endocrinology* 139: 2015-2024.

**PATIÑO, R.** (1997). Manipulations of the reproductive system of fishes by means of exogenous chemicals. *Prog. Fisheries Culture*. 59: 118-128.

**PETER, R.E., CHANG, J.P., NAHORNIAK, C. S., OMELJANIUK, R. J., SOKOLOWSKA, M., SHIH, S.H. and BILLARD, R.** (1986). Interactions of catecholamines and GnRH in regulation of gonadotropin secretion in teleost fish. *Recent Programme in Hormone Research*. 42: 513-548.

**PETER R.; H.R. HABIBI; T.A. MARCHANT; C. and NAHORNIAK.** (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.; M. SOKOLOWSKA and C.S. NAHORNIAK.** (1987b). Comparison of [D-Arg<sup>6</sup>, Trp<sup>7</sup>, Leu<sup>8</sup>, Pro<sup>9</sup> Net]-luteinizing hormone releasing hormone (sGnRH-A) and [Ala<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup> 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.E., LIN, H.R. and VAN DER KRAAK, G.** (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., YU, K.L., MARCHANT, T.A. and ROSEMBLUM, P.** (1990). Direct neural regulation of the teleost adenohipophysis. *J. Exp. Zool.* 4:84-89.
- PETER, R.E., TRUDEAU, V.L. and SLOLEY, B.D.** (1991). Brain regulation of reproduction in teleosts. *Bulletin of the Inst. Academia Sinica, Monograph* 16:89-118.
- POWELL, R.C.; KING, J.A.; and MILLAR, R.P.** (1985). [Trp<sup>7</sup>, Leu<sup>8</sup>]LH-RH in reptilian brain. *Peptides* 6: 223-228.
- POWELL, R.C., MILLAR, R.P. and KING, J.A.** (1986a). Diverse molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in an elasmobranch and a teleost fish. *General and Comparative Endocrinology.* 63:77-87.
- POWELL, R.C.; CIARCIA, G.; LANCE, V.; MILLAR, R.P. and KING, J.A.** (1986b). Identification of diverse molecular forms of GnRH in reptile brain. *Peptides* 7: 1101-1108.
- POWELL, R.C., JACH, H., MILLAR, R.P. and KING, J.A.** (1987) Identification of Gln<sup>8</sup>-GnRH and His<sup>5</sup>, Trp<sup>7</sup>, Tyr<sup>8</sup>-GnRH in the hypothalamus and extrahypothalamic brain of the ostrich (*Struthio camelus*). *Peptides* 8:185-190.
- POWELL J. F.F., ZOHAR Y., ELIZUR A., PARK M., FISCHER W.H., CRAIG A., RIVIER J.E., LOVEJOY D. and SHERWOOD, N.** (1994). Three forms of gonadotropin-releasing hormone characterised from brains of one species. *Proceedings of the Natural Academy of Science (U.S.A.)*. 91:12081-12085.
- POWELL J.F.F., RESKA-SKINNER, S., PRAKASH, M.O., FISCHER, W.H., PARK, M., RIVIER, J.E., CRAIG, A.G., MACKIE, G.O. and SHERWOOD, N.M.** (1996a). Two new forms of gonadotropin-releasing hormone in a protochordate and the evolutionary implications. *Proceedings of the Natural Academy of Science (U.S.A.)*. 93:10461-10464.
- POWELL J.F.F., KRUECKL, S.L. COLLINS, P.M., and SHERWOOD, N.M.** (1996b). Molecular forms of GnRH in three model fishes: rockfish, medaka and zebrafish. *Journal of Endocrinology.* 150:17-23.
- POWELL, J.F.F., STANDEN, E.M., CAROLSFELD, J., BORELLA, M., GAZOLA, R., FISCHER, W.H., PARK, M., CRAIG, A.G., WARBY, C.M., RIVIER, J.E., VAL-SELLA, M. and SHERWOOD, N.M.** (1997). Primary structure of three forms of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) from the pacu brain. *Regulatory Peptides.* 68:189-195.
- RAVAGLIA, M.A., LO NOSTRO, F.L., MAGGESSE, M.C., GUERRERO, G.A. and SOMOZA, G.M.** (1997). Characterization of molecular variants of GnRH, induction of spermiation and sex reversal using salmon GnRH-A and domperidone in the protogynous diandric fish, *Synbranchus marmoratus* Bloch, (Teleostei, Synbranchidae). *Fish Physiology and Biochemistry.* Issue 5, vol. 16, 425-436.
- SADOVY, I. and SHAPIRO, D.** (1987). Criteria for the diagnosis of hermaphroditism in fishes. *Copeia* 1, 136-156.
- SHERWOOD N., HARVEY B., BROWNSTEIN M., SPIESS J., RIVIER, J., and VALE, W.** (1983). Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. *Proceedings of the Natural Academy of Science (U.S.A.)*. 80:2794-2798.
- SHERWOOD, N.M; HARVEY, B., BROWNSTEIN, M. and EIDEN L.** (1984). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in striped mullet (*Mugil cephalus*), milkfish (*Chanos chanos*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*): comparison with salmon GnRH. *General and Comparative Endocrinology.* 55: 174-181.

**SHERWOOD, N.M., SOWER, S.A., MARSHACK, D.R., FRASER B. and BROWNSTEIN, M.** (1986a). Primary structure of gonadotropin-releasing hormone from lamprey brain. *Journal of Biol Chemistry*. 261:4812-4819.

**SHERWOOD, N.M., ZOELLER, R.T. and MOORE, F.L.** (1986b). Multiple forms of gonadotropin-releasing hormone in amphibian brains. *General and Comparative Endocrinology*. 61:313-322.

**SHERWOOD, N.M.** (1987). Brain peptides in the control of fish reproduction. En: *Proceedings of the Third International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. (ed. Por Idler, D.R., Crim, L. W., and Walsh, J.M.). Marine Science Research Laboratory, Memorial University of New Founland, New Flounland, Canadá. pp 5-12.

**SHERWOOD, N.M. and WHITTIER, J.M.** (1988). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) from brains of reptiles: turtles (*Pseudemys scripta*) and snakes (*Thamnophis sirtalis parietalis*). *General and Comparative Endocrinology*. 69:319-327.

**SHERWOOD, N.M.; DE LEEUW, R. and GOOS, H.** (1989). A new member of the gonadotropin-releasing hormone family in teleost: catfish gonadotropin-releasing hormone. *General and Comparative Endocrinology*. 75:427-436.

**SHERWOOD, N.M., DOROSHOW, S. and LANCE, V.** (1991). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in bony fish that are phylogenetically ancient: reedfish (*Calanoichthys calabaricus*), sturgeon (*Acipenser transmontanus*) and alligator gar (*Lepisosteus spatula*). *General and Comparative Endocrinology*. 84: 44-57.

**SHERWOOD, N.M. and LOVEJOY, D.A.** (1993). Gonadotropin-releasing hormone in cartilaginous fish: structure, location and transport. *Enviromental Biology of Fish*. 38:197-208.

**SHERWOOD, N.M., LOVEJOY, D.A. and COE, I.R.** (1993a). Origin of mammalian gonadotropin-releasing hormones. *Endocrine Review*. 14:241-254.

**SHERWOOD, N.M., GRIER, H. J., WARBY, C., PEUTE, J. AND TAYLOR, R.G.** (1993b). Gonadotropin-releasing hormones, including a novel form, in snook *Centropomus undecimalis*, in comparison with forms in black sea bass *Centropistis striata*. *Regulatory Peptides*. 46:523-534.

**SHERWOOD, N.M., K. von SCHALBURG and. LESCHIED, D.W** (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.

**SOMOZA, G., STEFANO, A.V., D'ERAMO, J.L., CANOSA, L.F. and FRIDMAN, O.** (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). *General and Comparative Endocrinology*. 94:44-52.

**SOMOZA, G.M.; PAZ, D.A. ; STEFANO, A.V and AFFANNI, J.M.** (1996). Identification of immunoreactive mammalian gonadotropin-releasing hormone in the brain of metamorphic larvae of *Bufo arenarum* Hensel (Amphibia anura). *International Journal of Developmental Neuroscience*. 14: 663-672.

**SOWER, S.A., CHIANG Y., LOVAS, S. and CONLON J.** (1993). Primary structure and biological activity of a third gonadotropin-releasing hormone from lamprey brain. *Endocrinology* 132:1125-1131.

**SUZUKI, K. KAWAUCHI, H. and NAGAHAMA, Y.** (1988). Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. *General and Comparative Endocrinology*. 71: 929-301.

**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 Doctoral en Ciencias Biológicas. UBA.FCEyN. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

**STEFANO, A.V., ALDANA-MARCOS, H.J., AFFANNI, J.M. and SOMOZA G.M.** (1999). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems in the pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes). *Fish Physiology and Biochemistry*. En prensa.

**TANG, F., CHANG, S.T.H. and LOFTS, B.** (1974b). Effects of mammalian luteinizing hormone on the natural sex reversal of the ricefield eel, *Monopterus albus* (Zuiew). *General and Comparative Endocrinology*. 24, 242-248.

**TAO, Y; LIN, H. VAN DER KRAAK, G. and PETER, R.** (1993). Hormonal induction of precocious sex reversal in the ricefield eel, *Monopterus albus*. *Aquaculture*. 118: 131-140.

**TRUDEAU, V.L, PETER, R.E. and SLOLEY, B.D.** (1991). Testosterone and estradiol potentiate the serum gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in goldfish. *Biology of Reproduction* 44: 951-960.

**TRUDEAU, V.L., SLOLEY, B.D., WONG, A.O.L. and PETER, R.E.** (1993). Interactions of gonadal steroids with brain dopamine and gonadotropin-releasing hormone in the control of gonadotropin-II secretion in the goldfish. *General and Comparative Endocrinology*. 89:39-50.

**TRUDEAU, V. L.** (1997) Neuroendocrine regulation of gonadotropin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *Review on Reproduction*. 2: 55-68.

**TSAI, P.S. and LICHT, P.** (1993). Differential distribution of chicken-I and chicken-II GnRH in the turtle brain. *Peptides* 14:221-226.

**UNDERWOOD J. ,HESTAND R. and THOMPSON B.** (1986). Gonad regeneration in grass carp following bilateral gonadectomy. *The Progressive Fish-Culturist* 48: 54-56.

**VAN DER KRAAK, G. and WADE, M.G.** (1994). A comparison of signal transduction pathways mediating gonadotropin actions in vertebrates. In: Davey, K. B., R.E. Peter and S.S. Tobe editors. *Perspectives in Comparative Endocrinology*. Ottawa: National Research Council of Canada, 1995, 59-63.

**VERMEULEN, G.J.** (1994). Testicular steroids and catecholamines in the brain of the African catfish, *Clarias gariepinus*, in relation to gonadotropin release. Utrecht: Ph.D. Thesis.

**VISSIO, P.G.; PAZ, D.A. and MAGGESE, C.** (1996). The adenohypophysis of the swamp eel, *Synbranchus marmoratus*: an immunocytochemical analysis. *Biocell* 20: 155-161.

**VISSIO P.G., A.V. STEFANO, G.M. SOMOZA, CM.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 banariensis*. *Fish Physiology and Biochemistry*. 21:121-127.

**WEBER, G.M., POWELL, J.F.F., PARK, M., FISHER, W.H., CRAIG, A.G., RIVIER, J.E., NANAKON, U., PARHAR, I.S., NGAMVONGCHON, S., GRAU, E.G. and SHERWOOD, N.M.** (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. *Journal of Endocrinology*. 155(1), 121-132.

**WHITE, S.A.; T.L. KASTEM; C.T. BOND; J.P. ADELMAN AND R.D. FERNALD.** (1995). Three gonadotropin-releasing hormone genes in one organism suggest novel roles for an ancient peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 92: 8363-8367.

**WHITE, R.B., EISEN, J.A., KASTEN, T.L., FERNALD, R.** (1998a). Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proceedings of the National Academy of Science (U.S.A.)*. 95:305-309.

**WHITE, R.B. and FERNALD, R.D.** (1998b). Ontogeny of Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression reveals a distinct origin for GnRH-containing neurons in the midbrain. *General and Comparative Endocrinology*. 112: 322-329.

**WU, P.; ACKLAND, J.F.; LING, W. and JACKSON, I.M.** (1986). Purification and characterization of luteinizing hormone-releasing hormone from codfish brain. *Regulatory Peptides*. 15:311-321.

**YARON, Z.** (1995) Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture* 129: 49- 73.

**YEUNG, W.S.B.; H. CHEN and S.T.H. CHAN.** (1993). Effects of LH and LHRH-Analog on gonadal development and *in vitro* steroidogenesis in the protogynous *Monopterus albus*. *General and Comparative Endocrinology*. 89:323-332.

**YU, K.L., SHERWOOD, N.M. and PETER, R.E.** (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. and PETER, R.E.** (1990). Alterations in gonadotropin-releasing hormone immunoactivities in discrete brain areas of male goldfish during spawning behavior. *Brain Research*. 26;512(1):89-94.

**YU, K.L. and PETER, R.E.** (1992). Adrenergic and dopaminergic regulation of gonadotropin-releasing hormone release from goldfish preoptic-anterior hypothalamus and pituitary *in vitro*. *General and Comparative Endocrinology*. 85(1):138-46.

**ZOHAR, Y.** (1989). Fish Reproduction: its physiology and artificial manipulation. In Shito, V. and S. Sarig (eds.) *Fish Culture in Warm Water Systems: Problems and Trends*. CRC Press, Boca Raton, Fl, USA pp65-119.

**ZOHAR, Y, A. ELIZUR, SHERWOOD, N., POWELL, J., RIVER, J. and ZAMORA, N.** (1995). Gonadotropin-releasing hormones present in the brain of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *General and Comparative Endocrinology*. 97: 289-299.

**Los resultados de la presente tesis fueron volcados en las siguientes publicaciones.**

\* F. Lo Nostro; M. Ravaglia; M. Maggese; G. Guerrero and G. Somoza.

"Characterization of molecular variants of GnRH in the brain of protogynous "swamp eel", *Synbranchus marmoratus*".

En "Reproductive Physiology of Fish; Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish". Editado por F.W. Goetz and P. Thomas. Libro de edición extranjera; científica, con referato. Full paper. The University of Texas at Austin, Marine Science Institute, TX, USA., p.74, 1995.

\* F. Lo Nostro and G. Guerrero.

"Presence of primary and secondary males in a population of *Synbranchus marmoratus*, Bloch 1795, a protogynous fish (Teleostei - Synbranchiformes)".

Con referato, científica, con indexación. "Journal of Fish Biology" 49,788-800, 1996.

\* F. Lo Nostro; M. Ravaglia; G. Guerrero; M.C. Maggese and G. Somoza.

"Inducción de la espermiación y reversion sexual mediante el tratamiento con s-GnRH-A y domperidona en el pez protoginico diandrico, *S. marmoratus* (Bloch, 1795).

En "Acuicultura en Latinoamerica", IX Congreso Latinoamericano de Acuicultura". Editado por A.Silva y G. Merino. Libro de edición extranjera, científica, con referato. Full paper. Universidad Católica del Norte, Facultad de Ciencias del Mar, Depto. de Acuicultura, Sede Coquimbo, Chile, p. 324 - 328, 1996.

\* M. Ravaglia; F. Lo Nostro, M. Maggese; G. Guerrero and G. Somoza.

"Characterization of molecular variants of GnRH, induction of spermiation and sex reversal using sGnRH-A and domperidone in the protogynous diandric fish, *Synbranchus marmoratus* Bloch, (Teleostei, Synbranchidae)".

Con referato, científica, con indexación. "Fish Physiology and Biochemistry A". Issue 5, vol. 16, 425-436, 1997.

\* Lo Nostro, Fabiana, Andreone, Luz, Guerrero, Graciela and Grier, Harry.

"Annual cycle of the testis in the swamp eel, *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae), a protogynic diandric fish".

En "Reproductive Physiology of Fish, Six International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish". Libro de edición extranjera; científica, con referato. Full paper. The University of Bergen, Noruega. 154, 1999.

\* Grier, Harry J. and Lo Nostro, Fabiana.

"The germinal epithelium in fish gonads: the unifying concept"

En "Reproductive Physiology of Fish, Sixth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish". Libro de edición extranjera; científica, con referato. Conferencia plenaria como full paper. The University of Bergen, Noruega, 128-132, 2000.

\* Lo Nostro, Fabiana, Andreone, Luz, Guerrero, Graciela and Grier, Harry.

"Seasonal changes in he testis in the swamp eel, *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae), a protogynic diandric fish". Enviado al Journal of Morphology, septiembre 2000.