

1.- INTRODUCCIÓN

En Acuicultura el desarrollo de los cultivos piscícolas depende en gran medida la capacidad que tengamos para controlar diversos aspectos del ciclo reproductor en los peces. En la práctica surgen una serie de problemas relacionados con la reproducción, especialmente en lo que se refiere a los cultivos de tipo intensivo. Los problemas principales son:

1.-La ausencia de ovulación y puesta en condiciones de confinamiento. En muchas especies de peces con importancia comercial tales como la dorada (Sparus aurata), la lubina (Dicentrarchus labrax) ó el mújol (Mugil cephalus) [y otras especies de agua dulce como el pez gato Ictalurus punctatus] la oogenésis no es completada cuando el animal se mantiene en cautividad bajo ciertas condiciones ambientales. Los oocitos se desarrollan hasta los últimos estadios de la vitelogénesis y a continuación sufren una degeneración rápida (atresia). Al no madurar los oocitos no hay ovulación y por lo tanto se aborta la puesta.

2.-Espermatogénesis debilitada. En algunos peces como la lubina en los que la espermiación en cautividad es muy limitada y frecuentemente insuficiente.

3.-Puesta excesiva e indeseable. El caso contrario a los anteriores se presenta en aquellas especies que ponen sin dificultad en cautividad y en los que las óptimas condiciones del cultivo inducen una puesta excesiva. Este hecho se suele encontrar en las especies de Tilapia en las que una puesta excesivamente abundante ocasiona un retraso en el crecimiento y da lugar a una cosecha pobre de peces de talla comercial. Es también el caso de especies alóctonas introducidas por el hombre y cuya propagación incontrolada se pretende evitar. O de aquellos peces herbívoros (Grass Carp) ó carnívoros (lubinas) que son introducidos en los cultivos para controlar la proliferación indeseada de plantas ú otros organismos acuáticos.

4.-Estacionalidad de las puestas. En la mayoría de las especies cultivadas en la zona templada tienen ciclos reproductores limitados a una época del año determinada. En el caso de la lubina, salmónidos y mújol la puesta es puntual y en el de la dorada, tilapia y peces gato la puesta se limita a unos pocos días dentro de una temporada determinada, pero sería deseable disponer de huevos y larvas durante todo el año.

5.-Puesta asincrónica. Por ejemplo en salmónidos en los que se consigue la puesta espontánea cada hembra ovula de acuerdo con su biorritmo individual, pero bajo el punto de vista práctico nos interesa que la puesta sea lo más sincronizada posible.

6.-Problemas relacionados con la diferenciación sexual. En Tilapia puede ser interesante la obtención se prefiere los machos porque crecen más rápido, mientras que en salmónidos ó anguila es la hembra la que tiene una tasa de crecimiento mayor.

7.-Muerte tras la reproducción. Es típico de los salmónidos del género Oncorhynchus, si se evita la maduración de las gónadas se puede alargar el periodo de crecimiento y cosechar peces mayores, así como prevenir las migraciones anadrómas de los salmónidos con las incómodas modificaciones en las técnicas de cultivo que estas conllevan.

Comprendiendo las interrelaciones entre genoma, medio ambiente y gametogénesis se pueden desarrollar soluciones (terapias) a los problemas mencionados anteriormente. En el tema que vamos a ver a continuación revisaremos en primer lugar la relación entre el medio ambiente y la gametogénesis, los aspectos hormonales relacionados con la determinación del sexo y la diferenciación sexual y por último la regulación hormonal de la gametogénesis.

2.- REGULACIÓN FISIOLÓGICA DE LA REPRODUCCIÓN

2.1.- Glándulas neuroendocrinas que regulan la reproducción.

La glándula pineal

Señales medioambientales tales como temperatura y fotoperiodo son traducidas a cambios hormonales que a su vez regulan la gametogénesis. La glándula pineal en los peces funciona como órgano fotorreceptor y como glándula endocrina. Posee células fotorreceptoras con un pigmento fotolábil que se activa durante la obscuridad dando lugar a trenes de impulsos originados por cambios de potencial de membrana. También es secretora indolaminas tales como la serotonina y la melatonina también llamada hormona pineal.

La información fotoperiódica puede ser convertida gracias a las células fotorreceptoras de la pineal en dos clases de mensajes que tienen un patrón circadiano: 1) la información nerviosa que es remitida a los centros del cerebro y 2) los mensajes hormonales a través de la secreción de una o varias neurohormonas liberadas al torrente circulatorio y posiblemente al líquido cerebro-espinal. En conclusión el órgano pineal en peces parece ser el responsable del control del fotoperiodo en la actividad de las gónadas, mediante las variaciones en los cambios circadianos de melatonina y la regulación de los ciclos diarios de liberación de gonadotropina.

El hipotálamo.

Como sucede en otros vertebrados, en respuesta a cambios en el medio externo o interno el hipotálamo de los teleosteos secreta pequeñas hormonas de naturaleza peptídica que se denominan hormonas liberadoras o inhibidoras. Estos péptidos atraviesan la corta distancia que separa el hipotálamo de la adenohipófisis, situada en la parte ventral del cerebro, justo por encima de la boca del pez, para controlar la actividad de las células gonadotrópicas de la adenohipófisis. Así, la secreción

de gonadotropina en peces teleósteos (carpa, anguila, trucha, salmón y tilapia) es regulada por dos factores uno estimulante la GnRH y un factor inhibidor (GRIF) que seguramente es la dopamina. Recientemente se aisló del cerebro de salmón una molécula que se denomina Hormona Liberadora de Gonadotropina ó sGnRH y se identificó como undecapeptido semejante a la LHRH de mamíferos pero distinta en dos de sus aminoácidos, aunque su actividad biológica es semejante. Al parecer hay otra segunda hormona liberadora que todavía no ha sido caracterizada. Existe una gran similitud estructural entre las GnRH de varias especies de telósteos entre ellas mújol, trucha y arenque, lo cual corrobora la poca especificidad de los factores liberadores de las gonadotropinas.

2.2.-Soporte hormonal.

Adenohipófisis. Gonadotropina.

Las células gonadotrópicas de la adenohipófisis secretan la gonadotropina, que pasa al torrente sanguíneo de los peces donde controlan los cambios hormonales y estructurales que suceden en testículos y ovarios. La gonadotropina interviene en numerables procesos de la reproducción en los peces: principalmente en la vitelogénesis, la maduración de los ovocitos y la ovulación, producción de hormonas esteroides. Hay algunas evidencias de que en peces existe más de una GtH.

Esteroides sexuales.

El lugar principal de síntesis de esteroides en peces son las gónadas. (Capas intersticial y granulosa y teca de los ovocitos y células de Leydig ó Sertoli en los testículos).

Hembra:

Estrógenos. El estradiol 17 β estimula la vitelogénesis exógena, induciendo la síntesis hepática de la fosfolipoproteína vitelogenina.

Andrógenos. Testosterona tiene un efecto estimulador sobre la liberación de gonadotropina.

Progestágenos. 17 α -hidroxi 20 β -dihidroprogesterona (MIS). Induce la maduración de los ovocitos y está asociada con el comportamiento reproductor durante el cortejo en hembras.

Macho:

Andrógenos: 11 cetotestosterona importante durante la espermiación y la migración del esperma a las vías deferentes.

Progestágenos. MIS controla la composición iónica del fluido semina y está asociada con el comportamiento reproductor durante el cortejo en machos.

Conjugados esteroides. Glucurónidos, pueden actuar como feromonas.

En general las hormonas esteroides sexuales ejercen un efecto de feedback negativo sobre la producción de gonadotropina en los ejemplares maduros y un efecto de feedback positivo en los ejemplares inmaduros.

Prostaglandinas. Están implicadas en la ovulación en los peces, seguramente por una estimulación de las contracciones de los folículos. También están implicadas en control del comportamiento sexual e incluso actúan como feromonas en la hembra.

3.- CONTROL DE LA REPRODUCCIÓN POR PARÁMETROS MEDIOAMBIENTALES

En la mayoría de los stocks salvajes de peces la puesta se ve limitada a una determinada época del año. Los factores ambientales sitúan esta época de puesta en un periodo que ofrece las mejores condiciones para la supervivencia de larvas y alevines. En la mayoría de los peces las puestas se realizan en el medio natural en áreas ecológicas muy bien definidas. Algunos peces realizan enormes esfuerzos para llegar a esas áreas. Las características ambientales específicas de las zonas de puesta provocan la maduración final de los ovocitos, la ovulación y la puesta. Por ello el control medioambiental de la gametogénesis conlleva tanto efectos a largo plazo sobre el proceso completo de la gametogénesis como efectos concretos sobre la espermiación, ovulación y la puesta. Al mantener los reproductores en cautividad evitamos que encuentren las condiciones óptimas necesarias para la reproducción. Esta es la causa principal de la falta de ovulación y puesta en las hembras de las granjas de cultivos. Logicamente manipulando las condiciones ambientales del stock de reproductores podremos tanto inducir la ovulación y la puesta como modificar la época de puesta de una especie determinada.

3.1.-Inducción a la ovulación y la puesta.

En las especies que ponen en verano como el pez dorado, la carpa común y la tenca, la elevación de la temperatura induce la ovulación y la puesta.

En las especies que ponen en invierno como la lubina, la puesta es inducida por la elevación suave de las bajas temperaturas.

En algunas especies como los ciprínidos es el tipo de substrato el que induce la puesta, por lo que se suelen introducir plantas acuáticas ó incluso de plástico para obtener los huevos.

También la presencia de del sexo opuesto es un factor que desencadena la puesta, en aquellas especies en las que hay un cortejo previo ala misma tales como la dorada. En ausencia de machos fluyentes las hembras ovulan pero no llegan a poner. En estos casos la puesta está estimulada por dos formonas distintas liberadas al medio por la hembra.

En muchas especies tropicales y subtropicales las lluvias torrenciales sincronizan las puestas, probablemente por los cambios en la composición química del agua. Por ello se puede inducir la puesta imitando las condiciones que se producen durante la época de lluvia tales como subir el nivel de agua en los estanques, llenar estanques con agua dulce, etc., Este método dá muy buen resultado con las carpas, y los peces gato.

Otro factor que desencadena la puesta en algunas especies es la presencia de alimento adecuado.

3.2.-Control de la época de puesta.

En las zonas templadas los factores ambientales que más afectan al ciclo reproductor son temperatura y fotoperiodo.

En salmónidos y peces marinos de aguas frías como el rodaballo, el factor ambiental que más influye en el ciclo

reproductor es el fotoperiodo, mientras que la temperatura tiene un efecto limitado. Una disminución de uno o dos grados retrasa la puesta durante 3 meses en el caso de la trucha arcoiris. Pero sólo las granjas que tienen acceso a fuentes de agua fría naturales, tales como manantiales, ríos de aguas más frías, corrientes marinas frías o zonas de upwelling pueden utilizar este sistema, pues en general el enfriar el agua en las granjas es un proceso excesivamente caro. Además un descenso repentino de las temperaturas puede provocar una reabsorción de los huevos (atresia folicular?).

Más utilizado es el uso de regímenes adecuados de fotoperiodo. La época de puesta de mayoría de los salmónidos en el hemisferio norte es en otoño e invierno cuando la duración del día va disminuyendo ó los días son ya cortos. En la trucha se puede modificar la duración de un ciclo reproductor variando la tasa de cambio del fotoperiodo en periodos más largos o más cortos. Aunque los huevos de ciclos más cortos son menores y los de ciclos más largos son mayores que los de un ciclo natural, no hay efectos en la calidad de los huevos. Efectos similares se obtienen utilizando combinaciones de días cortos y largos.

En peces marinos de aguas cálidas como el mújol, la dorada ó la lubina, la puesta se realiza durante el invierno y la gametogénesis es estimulada disminuyendo la duración del día y controlando la temperatura.

En lubina la puesta se consigue retrasar manteniendo los peces en el día más largo del año durante 6 meses. En dorada la puesta se controla manteniendo el fotoperiodo en el día más largo del año para después ir disminuyéndolo, así se puede retrasar la puesta 6 meses y obtener huevos durante todo el año.

También se puede obtener un desfase con respecto a la puesta natural reproduciendo las condiciones térmicas y de fotoperiodo de los ciclos naturales en 10 meses, en lugar de 12. Una vez conseguido el desfase se mantienen los ciclos desfasados pero de 12 meses.

En el caso de la lubina también es posible retrasar manteniendo los reproductores en agua salobre y transfiriéndolos de nuevo a agua de mar cuando se va a realizar la puesta.

En peces de aguas cálidas como los ciprínidos la temperatura es el factor ambiental predominante aunque el fotoperiodo también actúa como modulador de la gametogénesis. Por ejemplo en la carpa la época de puesta se limita al periodo durante el cual la temperatura vá aumentando, mientras que cuando la temperatura decrece el desarrollo del ovocito se para.

Temperatura y fotoperiodo apenas varían en las regiones tropicales. Sin embargo la mayoría de las especies tropicales presentan épocas de puesta definidas ó al menos picos de puesta. En estos casos la gametogénesis es sincronizada por factores ambientales ligados a la época de fuertes lluvias durante los monzones. Este es el caso del pez gato Africano, en el que la época de puesta coincide con el inicio de la estación lluviosa. Cuando estos peces son trasladados a zonas templadas fotoperiodo y temperaturas constantes adecuadas provocan la puesta durante todo el año.

Lógicamente una vez que la época de puesta ha sido modificada mediante el control del fotoperiodo el pez debe mantenerse en condiciones controladas de fotoperiodo o volverá a su ciclo normal en condiciones naturales. Todas estas manipulaciones del fotoperiodo se realizan en tanques cubiertos

en completa obscuridad y provistos de tubos fluorescentes que son ajustados semanalmente mediante temporarizadores.

El control de la puesta a través de los parámetros ambientales es particularmente interesante para peces como el rodaballo, la lubina y la dorada, porque al presentar una alta tasa de fecundidad sólo es necesario mantener un número relativamente pequeño de reproductores. Utilizando el control del fotoperiodo es posible obtener más de una época de puesta al año, aunque la respuesta de los peces es muy variable. Estos métodos son en general baratos y fáciles de instalar y según algunos autores más efectivos y con menos efectos secundarios que las inyecciones hormonales.

Algunos autores han sugerido incluso el control de la reproducción mediante la administración de melatonina, pues como hemos visto antes es la molécula que se encarga de traducir la información acerca de la situación del fotoperiodo que recoge la glándula pineal y los cambios circadianos que se producen en los niveles en suero de esta hormona se correlacionan con los de gonadotropina.

4.- CONTROL HORMONAL DE LA REPRODUCCIÓN

4.1.-Inducción de la maduración de los oocitos, ovulación y puesta.

Como ya hemos mencionado la ausencia de maduración de los ovocitos, ovulación y puesta, así como la puesta desincronizada, caracteriza a muchas especies de importancia comercial cuando son mantenidas en cautividad. La búsqueda de señales ambientales que son las inductoras primarias de la maduración, ovulación y puesta contribuirá al control y manipulación de todos esos procesos. En la actualidad las prácticas de inducción hormonal son muy frecuentes. Varias hormonas del eje hipotálamo-epífisis-gónadas han sido utilizadas para inducir la ovulación y la puesta.

4.1.1.-Gonadotropinas

La inducción de la ovulación y la puesta mediatizada por la gonadotropina ha sido experimentada en peces por tres caminos distintos:

1.-Aplicación de extractos de pituitaria. Las pituitarias de peces sexualmente maduros, ricas en gonadotropina, han sido utilizadas para inducir la puesta en numerosas especies. Esta técnica, conocida como hipofisación, fué introducida originalmente por Houssay en 1931 y es utilizada en multitud de granjas de peces comerciales. Posteriormente la introducción de técnicas para determinar el contenido en GtH confirmaron el aumento en GtH pituitaria durante la madurez sexual y la aparición de un pico de gonadotropina en los peces inyectados con extractos de pituitaria. En la mayoría de los casos se administran dos inyecciones, una una pequeña dosis inicial y una segunda que utiliza el esto de extracto.

2.-Aplicación de gonadotropinas de peces purificadas. La purificación de gonadotropinas de peces ha permitido su utilización para inducir la ovulación y la puesta. Sin embargo, hasta la fecha las gonadotropina en peces han sido producidas en

cantidades muy pequeñas. Sólo una preparación de gonadotropina parcialmente purificada de salmon del Pacífico, la SG-G100, ha sido producida en grandes cantidades. La SG-G100 ha sido inyectada para inducir la puesta y la maduración en salmones del Pacífico, lenguado japonés, mújol, pez gato, dorado y otras especies. En la actualidad no son utilizadas a nivel comercial debido al elevado coste de su preparación.

3.-Aplicación de gonadotropinas de mamíferos. La hormona luteinizante y la Gonadotropina coriónica humana son inductores efectivos de la maduración y ovulación de los peces. La GCH ha sido ampliamente utilizada en las granjas de peces por encontrarse con facilidad preparaciones de GCH a precios asequibles. Se administran una o dos dosis en distintas cantidades según la especie. Ej. Lubina: 800 y 1000 UI/Kg de GCH (ClNa 6/1 000) en dos inyecciones intramusculares con 6 horas de diferencia. Dorada: la inyección de HCG es efectiva en la inducción de la ovulación pero para que la puesta tenga lugar es necesario el masaje abdominal. Generalmente dos dosis de 100 a 300 UI/Kg.

La utilización de gonadotropina para inducir la puesta tiene varias ventajas. Principalmente los extractos de pituitaria y las inyecciones de CGH son fáciles de utilizar. Sin embargo han surgido algunos problemas: Las gonadotropinas de peces son de una alta especificidad específica: los extractos de pituitaria o las gonadotropinas purificadas son inactivas o muy poco eficaces en algunas especies. GCH es muy activa para algunas especies pero inefectiva en otras, en algunos casos como en la dorada y la lubina el número de hembras que reacciona positivamente es de sólo el 50 %. Además aquellas que responden positivamente al año siguiente no responden pues han producido anticuerpos contra una molécula que le es extraña: la GCH. Este fenómeno representa un obstáculo a la hora de realizar una selección genética de los reproductores. El contenido en gonadotropina del extracto de pituitaria es difícil de cuantificar, lo que complica la estandarización de las dosis que deben ser inyectadas. También, además de gonadotropina, los peces inyectados con extractos reciben una mezcla de otras hormonas hipofisiarias que pueden provocar efectos secundarios indeseables en la gametogénesis u otras funciones y el empleo de gonadotropinas específicas purificadas todavía requiere unos costes elevados. Además el número de hembras que reaccionan positiva

Estudios recientes han señalado que en los peces que no ovulan y ponen espontáneamente en cautividad hay una acumulación de gonadotropina en la hipófisis, por lo que los esfuerzos se han encaminado al desarrollo de las técnicas de inducción basadas en la estimulación de la liberación de la propia gonadotropina del pez estimulado.

4.1.2.-Esteroides

Como los esteroides son los inductores naturales de la maduración de los ovocitos, han sido incluidos en los protocolos de inducción hormonal en algunas ocasiones. En salmónidos, la inyección de la progestina 17α -hydroxy, 20β -dihidroprogesterona induce la maduración y la ovulación en las hembras con oocitos que están muy cercanos a la maduración. En estadios más precoces del desarrollo la inyección de progestina sólo induce la maduración de los ovocitos. Pero una dosis anterior de extracto

de pituitaria o de gonadotropina mejora la tasa de ovulación en las hembras inyectadas con progestina. Por lo tanto parece que la 17α -hysroxi, 20β -dihidroxi progesterona puede inducir la maduración de los ovocitos y es sólo seguida por la ovulación en peces en los que los niveles de gonadotropina endógena ya han empezado a aumentar. Pero si el aumento de gonaotropina preovulatorio no ha comenzado, es necesario administrar una pequeña cantidad de gonadotropina exógena para que la progesterona sea efectiva en inducir la maduración de los ovocitos seguida por la ovulación. En la practica los resultados de la inducción mediante progestina solamente no son prometedores. Pero si podría ser incluida en un protocolo de inducción hormonal para disminuir la cantidad total de gonadotropina necesaria para la inducción.

Se han utilizado otros esteroides en la regulación de la maduración de los ovocitos, pero unicamente los corticosteroides solos o en combinación con las gonadotropinas inducen la ovulación y la puesta. Además las dosis necesarias eran demasiado elevadas. La utilización de esteroides exceptuando la progestina no ha despertado mayor interés para los acuicultores.

4.1.3.-Prostaglandinas.

Las prostaglandinas pueden tener una misión importante en el desencadenamiento de la ovulación y en la regulación y sincronización del comportamiento reproductor. Su utilización como inductores de la puesta en combinación con un factor promotor de la maduración como por ejemplo las prostaglandinas o MIS puede ser importante en Acucultura aunque no ha sido investigado hasta el presente.

4.1.4.-Antiestrógenos.

Los esteroides gonadales, principalmente los estrógenos, tienen un efecto negativo en la liberación de gonadotropina en hembras sexualmente maduras. Intentando inducir la ovulación y la puesta a través de la liberación de la propia gonadotropina del pez, se ha tratado de evitar este efecto de feedback negativo mediante la administración de antiestrógenos. Los antiestrógenos que se han utilizado principalmente han sido citrato de clomifeno y tamoxifen. Estos compuestos compiten con los estrógenos por los sitios receptores de estrógenos, evitando las respuestas biológicas de los mismos. La administración de citrato de clomifeno ó tamoxifen, provocó el aumento en los niveles de gonadotropina en plasma en la carpa, y pez dorado, e indujo la ovulación en estos peces así como en pez gato, salmón y otras especies.

Si la persistencia de el efecto negativo de los estrógenos es importante en la regulación de la liberación de la gonadotropina ó es la responsable de la inhibición de la liberación de gonadotropina en los peces de cultivo son hipótesis que deben ser investigadas antes de poder aplicar a nivel de producción el uso de antiestrógenos como potenciadores de la liberación de gonadotropina.

4.1.5.-GnRH y GRIF

Como ya hemos visto la liberación de gonadotropina en peces estimula la ovulación de los ovocitos, la ovulación y la puesta. Cada vez hay más evidencias de que la ausencia de liberación de

gonadotropina es la razón por la que los peces no ovulan y ponen en cautividad.

El contenido de gonadotropina en la adenohipófisis de las hembras de *Sparus aurata* mantenidas en cultivos aumenta a medida que se acerca la época de puesta. Sin embargo los niveles de *gonadotropina en plasma no sufren ninguna modificación* y los ovocitos vitelogénicos sufren una atresia. La inyección de la hormona liberadora de la gonadotropina de mamíferos en las hembras de *Sparus aurata* con ovocitos en estadios finales de la vitelogénesis induce un incremento repentino en los niveles plasmáticos de GtH que es seguido de la maduración y ovulación. Es decir, en las hembras de dorada la gonadotropina se acumula en la glándula pituitaria pero no es liberada al torrente circulatorio a no ser que sea inyectada con la Hormona liberadora de GtH. Este fallo en la liberación de GtH es probablemente común a todas aquellas especies que no ovulan ni ponen espontáneamente en cautividad. Incluso en aquellos que si ponen en cautividad, la inyección de GnRH es utilizada para adelantar ó sincronizar las puestas. La utilización de Hormona liberadora de la GtH tiene varias ventajas sobre las gonadotropina a la hora de inducir las puestas:

1.-La GnRH y otras sustancias análogas estimulan la liberación de la gonadotropina secretada de forma natural por el propio organismo.

2.-Pueden ser fácilmente sintetizadas y obtenidas en forma pura.

3.-Presentan un grado bajo de especificidad específica. Las GnRH de mamíferos pueden ser utilizadas con éxito en peces.

4.-A ser pequeños péptidos no dan lugar a reacciones inmunológicas.

5.-En la práctica se requieren dosis pequeñas, del orden de microgramos por kilo de pez, lo cual es económicamente ventajoso.

La inducción a la puesta mediante GnRH y sus análogos se ha extendido recientemente a muchos peces de importancia comercial.

Algunas de las características más importantes de esta técnica son:

1.-En una gran cantidad de especies se ha logrado inducir la ovulación y la puesta con análogos de la LHRH de mamíferos. La GnRH de teleosteos (sGnRH) sólo difiere de la LHRH en dos aminoácidos. En 1984 MacKenzie et al., demostraron que la sGnRH es equipotente a la LHRH estimulando la liberación de GnH in vitro. Los mismos resultados se obtuvieron para la dorada in vitro e in vivo, de lo que se desprende que no hay diferencia en estas dos moléculas en sus afinidades por los receptores a nivel hipofisiario o en su resistencia a la degradación enzimática. Los trabajos de Peter et al., concluyen que los receptores hipofisiarios de GnRH en los peces son menos específicos que los de mamíferos. Zohar et al., demostraron que sGnRH y LHRH son degradadas con la misma rapidez por las peptidasas ligadas al citosol de la pituitaria, hígado y riñón de *Sparus aurata*. Los principales sitios de degradación eran los enlaces Tyr5-Gly6 y Pro9-Gly10NH2. La sustitución del aminoácido GLY en sGnRH y LHRH por aminoácidos dextrogiros, resultaba en una actividad biológica in vitro semejante, pero eran mucho más activas (superactivas) in vivo que sGnRH y LHRH. Esta biopotencia de los análogos de la sGnRH in vivo parece ser debida a una mayor resistencia relativa a la degradación enzimática. Concretamente el factor más importante que determina la biopotencia in vivo de estos

nanopéptidos es la substitución del D-aminoácido 6. Pero todavía son necesarias posteriores investigaciones para determinar cuáles son los nanopéptidos análogos a la sGnRH más activos para provocar la ovulación y puesta en los peces de cultivo.

2.-Interacción entre GnRH y GRIF en el control de la ovulación.

Debido al control dual de la liberación de la GtH, la eficacia de la acción inductora a la ovulación de la GnRH puede ser dependiente de la acción inhibidora de la de la dopamina, al menos en algunas especies. En estas especies, los análogos de la GnRH aunque son capaces de provocar la liberación de la gonadotropina, no pueden inducir la ovulación. Pero los antagonistas de la dopamina, tales como el pimozide ó el domperidone potencian el efecto de los análogos de la GnRH que inducen la liberación de GtH y la ovulación. Esto sucede en los ciprínidos, pez gato africano y otros peces. Sin embargo, en peces como la lubina, la dorada, el lenguado, el salmón blanco, el mújol, ó el arenque, y en determinadas condiciones ambientales, una pequeña cantidad de GnRH es suficiente para conseguir la puesta sin necesidad de utilizar los antagonistas de los GRIF.

3.- La forma de administrar la GnRH.

Los análogos de la GnRH que son resistentes a la degradación enzimática tienen una vida media bastante prolongada en comparación con las hormonas liberadoras. Sin embargo cuando son inyectados en dosis normales para inducir la ovulación desaparecen rápidamente de la circulación de 30 min a dos horas (dorada) según la especie, provocando un aumento en los niveles de gonadotropina que dura unas 48 horas. Este periodo puede no ser suficiente en el caso de que las hebras no se encuentren ya al ser inyectadas en los estados finales de la vitelogénesis. Más aún en peces con desarrollo ovárico asincrónico, que pueden poner huevos muchas veces sucesivas, una sola inyección de GnRH puede provocar sólo una ovulación parcial como sucede en el caso de la dorada o las lubinas *Dicentrarchus labrax* y *Lates calcarifer*. Las inyecciones múltiples se descartan debido al stress que conllevan en el animal. Por ello se han utilizado ultimamente métodos de administración retardada: bien por pellets que contienen agonistas de LHRH o GnRH rodeadas por colesterol o colesterol celulosa para retardar su liberación al torrente circulatorio, o por implantes con efecto retardado.

La combinación de agonistas de la GnRH de peces que son superactivos, con la liberación retardada de los mismos ofrece la mejor opción para la inducción de la ovulación y la puesta en peces de cultivo. La continua liberación de gonadotropina estimulada por concentraciones mantenidas de GnRH en peces representa una diferencia muy marcada con los mamíferos en los que una continua administración de GnRH inhibe la secreción de gonadotropina, indicando que los peces carecen de el efecto de desensibilización en la respuesta de la adenohipófisis a la administración crónica de GnRH que está presente en mamíferos.

4.2.-Inducción de la espermiación.

En la mayoría de las especies de peces que no ponen en cautividad el fallo en la reproducción está localizado en la hembra. El desarrollo testicular generalmente es completado en cautividad y los machos ponen espontáneamente. En la dorada que es hermafrodita proterándrico, todos los individuos funcionan

primero como machos y luego como hembras. Mientras que en la fase en que son machos la espermiación y la puesta son espontáneas, una vez que se convierten en hembras no siempre ovulan espontaneamente. Pero en algunas especies de peces la espermiación en los machos se inhibe o se ve reducida en condiciones de cautividad. Cuando esto sucede se aplican tratamientos con hormonas tales como: gonadotropinas, esteroides gonadales u hormonas liberadoras de gonadotropina.