

Extracto hipofisiario de Coporo (*Prochilodus mariae*) como agente inductor sustitutivo en la reproducción de su misma especie

José González^{1*}, Glenn Hernández², Orlando Messia¹ y Aniel Pérez¹

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas INIA. Estado Guárico-Guanapito, Altagracia de Orituco, estado Guárico.

* Correo electrónico: jgonzalez@inia.gob.ve

²INIA- CENIAP, Departamento Acuicultura y Pesca.

RESUMEN

La inoculación exógena de gonadotropina y otras sustancias, para reactivar el ciclo reproductivo de especies de interés comercial, que no desovan en condiciones de cautiverio, amerita hoy en día la compra de costosos agentes inductores importados. Por tales razones, en el presente trabajo se evaluó el potencial biológico de hipófisis de ejemplares autóctonos, como agente inductor sustituto, en la reproducción de especies icticas. El Coporo, *Prochilodus mariae*, por su facilidad de cultivo, filogenia y precocidad reproductiva, fue seleccionado como la especie donadora de hipófisis. El estudio comprendió la preparación y mantenimiento de los ejemplares donadores en estanques; con la finalidad de determinar el índice gonosomático; extracción de la hipófisis, deshidratación, almacenaje y prueba del material. Para medir la efectividad biológica, se utilizaron tanques circulares de 3.000 l, con 3 hembras y 3 machos de Coporo, con la aplicación de 2 tratamientos, un testigo y con 4 repeticiones: El primero consistió en la inoculación hormona de Carpa (2 mg kg⁻¹), el segundo con hipófisis de Coporo (2 mg kg⁻¹) y el testigo con suero fisiológico (1 ml). Se extrajeron y almacenaron un total de 107 glándulas de 127 ejemplares utilizados, con un porcentaje de pérdida de 15%. Los resultados del bioensayo muestran que los dos tratamientos con extractos hormonales dieron resultados positivos en inducir el desove del Coporo y no difieren significativamente al comparar las medias de eficiencia $\alpha=0,05$. En conclusión es factible la sustitución del material hormonal importado de Carpa como agente inductor de las especies reofilicas, por extractos hipofisiarios homoplásticos en la reproducción de inducida del Coporo.

Palabras clave: reproducción, agente inductor, *Prochilodus mariae*, Coporo.

Pituitary extract of Coporo (*Prochilodus mariae*) as a substitute inducing agent in the reproduction of their species

ABSTRACT

Inoculation of exogenous gonadotropin and other substances, to reactivate the reproductive cycle of species of commercial interest, not able to spawn in captivity, warrants today the purchase of expensive imported inducing agents. Therefore, it is essential to assess the biological potential of native pituitary, in the reproduction of fish species of commercial interest. The Coporo for its ease of cultivation, early reproductive and phylogenetic relationship, was selected as a kind of pituitary donor. The study included the preparation and maintenance of donors in ponds, with the purpose of determining gonosomatic index; pituitary extraction, drying, storage and testing of the material. To measure the biological effects, using circular tanks of 3.000 l, with 3 females and 3 males Coporo, with the application of two treatments, a control and four repetitions: The first consisted of inoculation pituitary carp (2 mg kg⁻¹), the second of pituitary coporo (2 mg kg⁻¹) and the physiological serum (1 ml). They were extracted and stored, a total of 107 glands of 127 used, with a loss of 15%. The results of bioassays showed

that the two treatments inductors with hormonal extracts were positive in terms of reproductive efficiency, and do not differ significantly ($P = 0,05$). In conclusion it is feasible to replace the imported material hormone as an agent of carp inductor of reofilic species by pituitary extracts homoplásticos induced in the reproduction of the Coporo.

Keywords: reproduction, agent inducer, *Prochilodus mariae*, Coporo.

INTRODUCCIÓN

Existen en la naturaleza peces que se reproducen espontáneamente, tanto en aguas libres, como confinados en estanques, y otros que se inhiben de hacerlo en condiciones de cautividad, ya que, bajo estas condiciones no reciben los estímulos apropiados para el desove, y en consecuencia no se activa el eje cerebro-hipofisis-gonadas. Este es el caso de muchas de las especies llaneras venezolanas reofilicas comerciales, que normalmente exhiben en sus hábitat naturales movimientos migratorios en la época reproductiva, buscando sitios con parámetros ambientales adecuados para garantizar la perpetuación de la especie (Rodríguez y Kossowski 2004). La activación de las vías neuro-secretoras negativas como consecuencia de la carencia de información adecuada externa, impide la producción y liberación normal de hormonas sexuales, que actúan en el proceso de maduración final y desove de estas especies.

Al respecto, Donaldson y Hunter (1982), señalan que hay razones fundamentales para que ciertas especies de peces de importancia alimenticia y económica, al ser mantenidos en cautiverio, no se reproduzcan. Las condiciones ambientales en los estanques son disímiles de aquellas prevaecientes en el medio natural durante la época del desove. Los factores ambientales que actúan en contra del desove normal, podrían inducir respuestas fisiológicas específicas e impedir la culminación del ciclo reproductivo normal, por ejemplo, condiciones inapropiadas de salinidad, temperatura, precipitación, foto-período, presión hidrostática y ausencia de un substrato favorable para el desove.

En época de lluvias las crecidas de los ríos son fenómenos repetitivos del ciclo, que permiten la reproducción, dispersión y abundancia de los peces.

La inoculación exógena de gonadotropina para reactivar las vías positivas del ciclo reproductivo de especies de interés comercial como la Cachama,

Colossoma macropomum, (Palmira *et al.*, 2001), amerita de la compra de onerosos y a veces no disponibles de agentes inductores importados (Bermúdez *et al.*, 1979; Uzcátegui 1991; Harvey y Carolsfeld 1993). Por su parte, Sánchez *et al.*, 2006, afirman que el más usado hoy en día, es el extracto hormonal de Carpa (*C. carpio*), siendo también uno de los más costosos.

Se ha tratado de inducir la reproducción de peces con varias sustancias que promueven el proceso reproductivo de especies nativas, buscando mayor eficiencia y economía tales como: antagonistas dopaminérgicos (Pimozide), análogos de la hormona liberadora de las gonadotropinas, gonadotropinas de otros animales (LHRH-A), González *et al.*, 1991, gonadotropinas de otras especies (HCG), Valencia *et al.*, 1985 y extractos hormonales de hipofisis de peces (GTH), Bernardino y Aparecido, 1986; Woynarovich 1986; González y Heredia, 1998; Venero y Kossowski, 2004.

El protocolo de trabajo de la presente investigación se basa específicamente en lograr obtener una metodología de extracción, almacenaje y utilización efectiva de la hipofisis de Coporo, *Prochilodus mariae*, sobre el proceso de inducción a la reproducción en la misma especie, dadas las ventajas relativas que presenta esta especie, como lo son: un corto período de maduración, facilidad de cultivo y corta distancia filogenética con relación a las especies receptoras, lo cual permitiría en el futuro, extender su utilización a otras especies de importancia piscícola en el país como la Cachama, (González y Heredia, 1998).

MATERIALES Y MÉTODOS

El proyecto se llevó a cabo en la Estación Experimental Guanapito, durante los años 2005, 2006 y 2007, contando con la disponibilidad de ejemplares reproductores de Coporo F1, nacidos y criados en estanques de la estación. La cual se encuentra situada al nor-oriente del estado Guárico, en las coordenadas, 9° 35' longitud Norte y 66° 20'

de longitud Oeste, a una altura de 439 m.s.n.m., con una temperatura ambiental promedio de 28 °C y 1.900 mm de precipitación promedio anual.

Recolección de datos

Los ejemplares donantes, fueron mantenidos a una ración diaria de 3 % de su peso con alimento comercial al 25 % de proteína cruda, en estanques de cultivo en la Estación Local Guanapito (1.500 m² de superficie). La captura se realizó a través de un chinchorro de 55 m de largo, y 1,27 cm entre nudos, utilizando el procedimiento de arrastre a las orillas, en forma de abanico. Luego los ejemplares capturados donantes se trasladaron del sitio de colecta, hasta el laboratorio de reproducción, para efectuar la extracción de hipófisis y gónadas. Para ello, se tomaron registros de peso, talla, sexo y peso de las gonadas de las especies de Coporo durante los meses previos a la época reproductiva (marzo abril y mayo). Se determinó el estadio gonadal (Nikolsky 1963), y también se midieron los parámetros físicos y químicos del agua: temperatura y oxígeno disuelto, pH, alcalinidad y conductividad.

Determinación del índice gonosomático

El índice gonosomático se determinó mediante la siguiente relación:

$$IG = \text{Peso de Gónadas} / \text{Peso total del pez}$$

El peso de las gónadas se tomó una vez que fue retirado todo el tejido adiposo y material conjuntivo adherido, y el peso total del pez se tomó incluyendo el peso de las gónadas.

Extracción de la hipófisis

La extracción de la hipófisis se llevó a cabo de acuerdo al proceso reportado por Woynarovich (1977). Se realizó una disección triangular en la parte dorsal de la cabeza, comenzando por encima de las órbitas oculares, y otra vertical por delante de la espina de la aleta dorsal. Seguidamente se levantó la cubierta cefálica observando el tejido cerebral, inmediatamente debajo de este y detrás del quiasma óptico encontramos alojada la hipófisis, en piso craneal, específicamente en la estructura ósea denominada la silla turca (Figura 1).

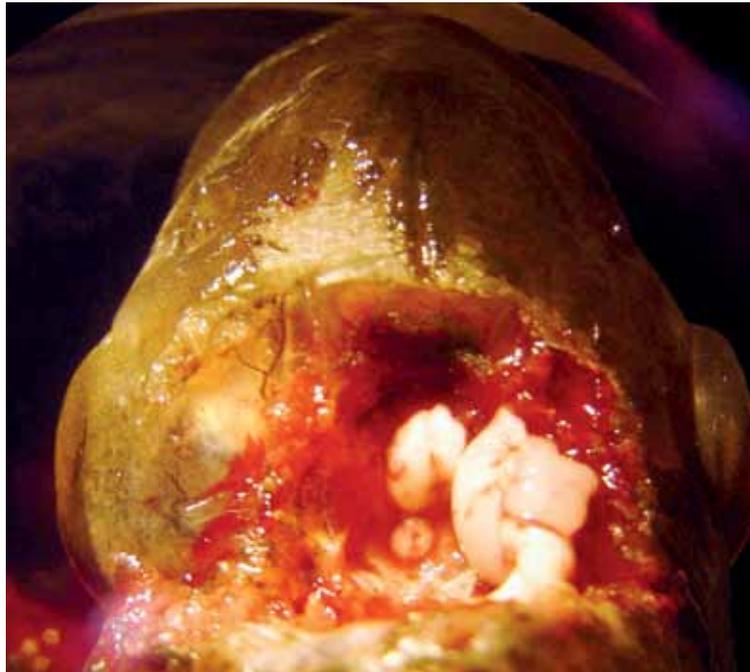


Figura 1.- Región cefálica del un ejemplar de Coporo (*P. mariae*), mostrando la ubicación y características de la glándula hipófisis (aumento 10X).

Luego de localizar y extraer la hipófisis se procedió a su deshidratación sumergiéndola en acetona pura durante 48 h cambiándole líquido a las 24 h (Pickford y Atz 1957). Para su almacenamiento definitivo se dejó secar y guardó en forma separada de acuerdo al sexo y a la fecha de recolección en viales de 1 ml, debidamente identificados para posteriormente realizar las pruebas *in vivo* de la reproducción.

Los protocolos de tratamientos utilizados en el bioensayo se pueden observar en el Cuadro 1. En los 4 ensayos repetitivos fueron realizados utilizando estanques de fibra de vidrio de 3.000 l, donde fueron colocados 3 parejas de diferentes sexos de Coporo, 3 macho y 3 hembras, a quienes se les aplicaron indistintamente los siguientes tratamientos: T1; inoculación de extractos hipofisarios de Carpa (dosis: 2mg/kg/1ml suero fisiológico), en dos aplicaciones, una preparatoria del 25 %, de la dosis total calculada y una definitiva o desencadenante con el 75 % restante a las 12 h de la primera inyección; T2: inoculación de extractos hipofisarios de Coporo, con igual dosis y bajo el mismo esquema de aplicación de la anterior, y finalmente aplicación del testigo del excipiente utilizado para la dilución de la hormona: 1ml de suero fisiológico. Los resultados de eficiencia del inductor se consideraron positivos cuando una después de aplicar el inductor la repuesta de los ejemplares fue positiva al desove y eclosión de los ovocitos a larvas. El valor de eficiencia reproductiva se obtuvo, al dividir la cantidad de ejemplares que respondieron en forma positiva en el tratamiento, entre la cantidad total de ejemplares inyectados (Cuadro 1).

La media de eficiencia reproductiva obtenida de los diferentes tratamientos resultados fueron comparadas entre si y con el testigo en base a una prueba de z para comparación de medias muestrales, a un nivel de significancia del $\alpha = 5\%$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se colectó en total una muestra 126 ejemplares de Coporo, de los estanques de la Estación Local Guanapito, 75 machos y 51 hembras, los cuales fueron utilizados como donantes de hipófisis. A partir de los cuales, se lograron extraer y preservar 107 glándulas de diferentes meses de los años 2005 y 2006, con porcentaje de pérdida de glándulas (Pgl) del 15% (Figura 2).

La Figura 2 muestra que durante los períodos de sequía, en los meses de marzo abril y mayo las Pgl disminuyen en comparación a los otros meses del año, es decir la mayor Pgl observadas, ocurren en épocas de menor actividad reproductiva, esto es debido principalmente al menor tamaño observado de la hipófisis. El tamaño promedio medido de la glándula en Coporo es 2,1 mg, lo que podría constituir una desventaja de la especie como donadora de hipófisis, si la comparamos con la de la Cachama de 7,4 mg. Sin embargo, es más fácil disponer masivamente ejemplares de Coporo, que de Cachama como donantes para el establecimiento de un significativo banco de hipófisis.

El índice gonosomático de los ejemplos examinados muestra una tendencia a aumentar durante la época de sequía (marzo-mayo; Cuadro 2), previo al proceso reproductivo que tienen lugar cuando inician las lluvias en los ecosistemas llaneros (mayo-julio). Al respecto González 1980, encontró resultados similares en especies de caribe *Pygocentrus cariba* y otras especies llaneras estudiadas en ambientes naturales, lo que evidencia una preparación somática reproductiva para el desove.

En la Figura 3 podemos observar la composición de los diferentes estadios gonadales encontrados en los ejemplares donadores, los estadios III, IV y V,

Cuadro 1. Protocolo de inducción de Coporo (*P. mariae*) con extractos hormonales de Carpa (*C. carpio*) y Coporo (*P. mariae*).

Tratamiento	Cantidad	Dos dosis	Réplicas
I Hipófisis de Carpa	2 mg/kg en 1ml	25% - 75%	4
II Hipófisis de Coporo	2 mg/kg en 1ml	25% - 75%	4
III Suero fisiológico	1 ml	1ml -1ml	4

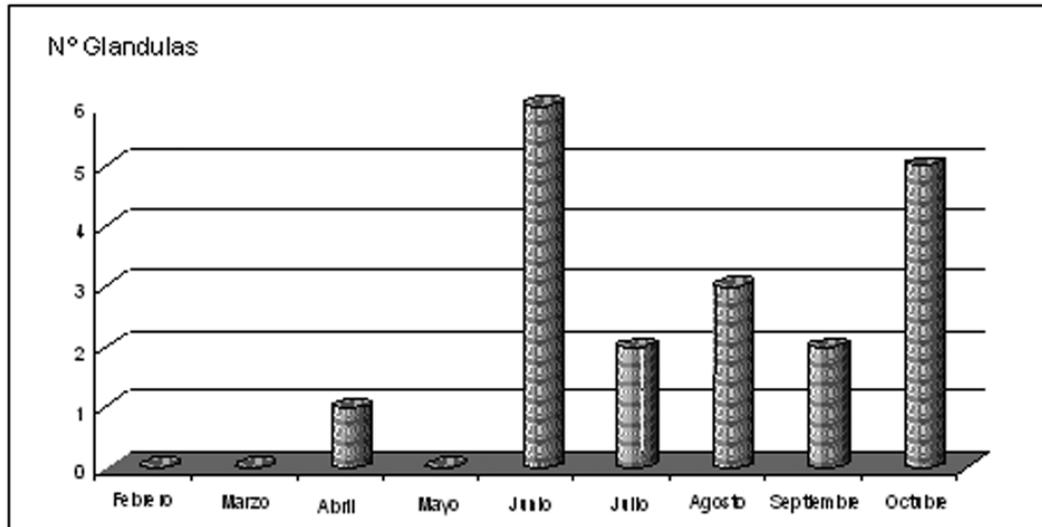


Figura 2.- Número de glándulas de Coporo (*P. mariae*), perdidas durante en el proceso de extracción.

Cuadro 2. Peso, largo estándar, peso de las gónadas e índice gonosomático durante el período de observación de los ejemplares donadores de hipófisis1.

Fecha muestreo	Peso (g)	LS (cm)	Peso gónada (g)	IG
2-8-05	485,6 ± 294,5	26,78 ± 4,89	59,85± 78,6	0,06± 0,09
11-8-05	1192 ± 396,3	36 ± 3,74	51,83± 76,9	0,05± 0,06
19-9-05	854 ± 718,0	34,22 ± 11,7	46,38± 91,7	0,03± 0,05
23-2-06	272,5 ± 718,0	22,65 ± 3,74	1,22± 0,92	0,005± 0,005
22-3-06	187,5 ± 5,9	30,1 ± 16,5	25,03± 35,0	0,11± 0,15
2-4-06	356,6 ± 149,0	24,1 ± 2,92	22,17± 23,8	0,05± 0,04
23-5-06	787,5 ± 178,6	27,6 ± 1,4	180,17± 94,7	0,21± 0,09
23-6-06	196,7 ± 431,5	14,22 ± 7,46	20,19± 64,3	0,03± 0,04
28-7-06	76,6 ± 28,9	13,6 ± 1,68	7,16± 8,3	0,09± 0,08
23-8-06	50,71 ± 13,2	11,9 ± 1,2	0,34± 0,27	0,006± 0,006
25-9-06	70,9 ± 29,1	13,25 ± 1,94	0,63± 0,26	0,007± 0,003
20-10-06	57,7 ± 19,2	12,38 ± 1,4	0,41± 0,29	0,007± 0,006

± Desviación estándar (n=126)

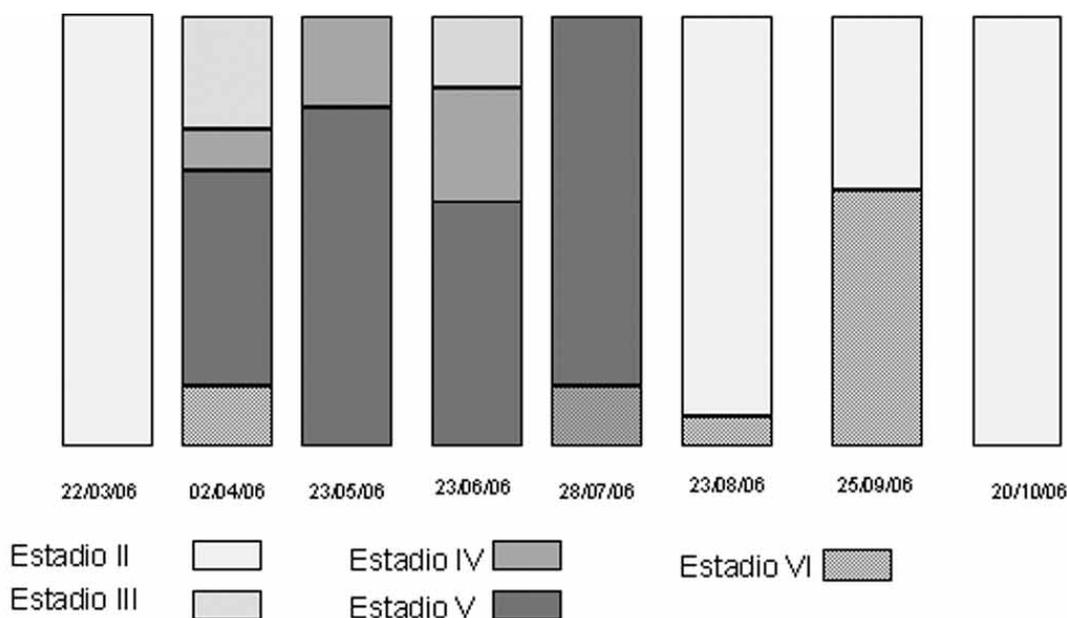


Figura 3. Estadios gonadales observados en los ejemplares de *P. mariae*, durante el proceso de extracción de hipófisis.

son los más importantes en cuanto a contenido de gonadotropina, en la hipófisis, por tal razón el período de recolección de glándulas debe extenderse desde el mes de abril hasta julio.

Los valores de oxígeno disuelto en los estanques, durante el período de preparación de los ejemplares donadores de hipófisis, se mantuvieron a niveles altos, en los meses de mayor desarrollo gonadal (abril y mayo). Los valores de temperatura en los estanques se observan estables, con una pequeña baja al comienzo del año.

Los datos de alcalinidad se mostraron inversamente proporcional, con relación al índice gonosomático. Finalmente la transparencia en los estanques, varió poco, observándose los valores más bajos al comienzo del año (Cuadro 3)

Los resultados de eficiencia reproductiva obtenidos de las experiencias de inducción, utilizando los diferentes agentes inductores (extractos hipofisiarios de Carpa y de Coporo) en reproductores de Coporo, como especie receptora, se pueden observar en el Cuadro 4.

La eficiencia reproductiva mostrada por ambos inductores se puede definir como alta, 66,6 %, para extractos hipofisiarios de Carpa y 58,3 %, con extractos hipofisiarios de Coporo, no se determinaron diferencias significativas, en la comparación de las

medias de las eficiencia reproductiva, entre ambos tratamientos al 95 % de confianza, lo que indica, que los agentes inductores examinados, actúan de manera similar, activando la reproducción del Coporo en condiciones de cautiverio, en consecuencia es factible la sustitución de hormona importada (Carpa), por material autóctono (Coporo), lo cual abre un campo de trabajo, para explorar su utilización en otras especies de interés comercial.

CONCLUSIONES

Se logró la inducción efectiva de la reproducción del Coporo, con extractos hipofisiarios homoplásticos.

No se determinaron diferencias significativas en la utilización de hipófisis de Carpa e hipófisis de Coporo, en la activación del ciclo reproductivo del Coporo, por lo que es factible su sustitución en el proceso.

La pérdida hipófisis en el proceso de extracción se relaciona con el estado de madurez del ejemplar receptor y tamaño de la glándula.

RECOMENDACIONES

Continuar el proceso de inducción asistida empleando la hipófisis de Coporo en la Cachama como receptor, para reducir al mínimo la dependencia de la hipófisis de Carpa como insumo importado.

Cuadro 3. Parámetros físico y químicos en los estanque de preparación de los ejemplares donadores de Coporo (*P. mariae*).

Fecha de muestreos	Temperatura °C	O ₂ mg/l	Alcalinidad mgCaCO ₃ /l	Transparencia cm	pH
23-2-06	27	5,1	160	40	7,5
22-3-06	24	4	150	90	7,5
2-4-06	21	4,9	200	85	7,5
23-5-06	26	5,9	50	35	8,5
23-6-06	24,5	4,1	170	40	8,5
28-7-06	27	4	140	35	7,5
23-8-06	27	4	140	15	8,5
25-9-06	27	2,1	130	10	8
20-10-06	26	3,2	140	20	7,5

Cuadro 4. Resultados obtenidos de los protocolo de inducción de Coporo (*P. mariae*) con extractos hormonales de Carpa (*C. carpio*) y coporo (*P. mariae*).

	Hembras	Suero	Hipófisis. Carpa	Efic. %*	Hipófisis Coporo	Efic.%*	Fecha
Ensayo 1	9	3:0	3:2	66,6	3:1	33,3	25/05/2007
Ensayo 2	9	3:0	3:1	33,3	3:2	66,6	06/06/2007
Ensayo 3	9	3:0	3:3	100	3:2	66,6	16/06/2007
Ensayo 4	9	3:0	3:2	66,6	3:2	66,6	29/06/2007
Eficiencia		0		66,6*		58,3*	

Efic. %*= porcentaje de eficiencia de inducción (desoves positivos / número total de emeplares)

**.:No hay diferencias significativas al 95 % de confianza

LITERATURA CITADA

- Bermúdez D., Prada N. y C. Kossowski, 1979. Ensayo sobre la reproducción de la Cachama *Colossoma macropomus* (Cuvier) 1818 en cautiverio. Universidad Centro Occidental, Barquisimeto, p. 23.
- Bernardino G. y V. Aparecido, 1986. Reproducao artificial do Tambaqui, *Colossoma macropomum*, síntesis dos trabalhos realizados com especies do género *Colossoma*, CEPTA. Projecto, Acuicultura/Brasil, 3-P-76-0001-CIID, Ministerio de Agricultura, p 12.
- Donaldson, E.M. and Hunter, G.A., 1982 Sex control in fish with particular reference to salmonids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39, 99–110.
- González, J. 1980. Reproducción y Crecimiento del caribe colorado *Serrasalmus notatus* Luektken 1874, (Teleostei, Characiformes Characidae), en los llanos venezolanos, UCV, Facultad de Ciencias, Trabajo Especial de Grado.
- González, J., H. Guerrero, G. Cáceres y D. Marcano. 1991. Reproducción inducida de la Cachama, (*C. macropomum*), con extracto hipofisiario y un análogo de la hormona liberadora de las gonadotropinas (LHRH-A). *Acta Científica Venezolana*, Vol. 42, N° 4, 1991.
- González, J. y B. Heredia, 1998. El Cultivo de la Cachama, Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Centro de Investigaciones del Estado Guárico, 2da. Ed. Maracay, 134 p.
- Harvey, B. y J. Carolsfeld. 1993. Induced breeding in tropical fish culture, Ottawa, Ont., IDRC, x +144.
- Nikolsky, G. 1963. *The ecology of fishes*. Academia Press. London and New Cork. p. 145-187.
- Palmira P., P. Pérez, F. Alcántara, R. Bocanegra y I. Orbe, 2001. Reproducción inducida de la Doncella *Pseudoplatystoma fasciatum* y desarrollo embrionario larval. *Folia Amazónica* vol. 12 (1-2) - 2001 IIAP 141.
- Pickford, G.E. and Atz, J. W., 1957 “The Physiology of the Pituitary Gland of Fishes”. *N. Y. Zool. Soc.*, New York. p. 23, 613.
- Sánchez, S., González, A., Ortiz, Julio C. y J. Roux. 2006. Utilización de hipófisis de diferentes peces autóctonos y extracto hipofisiario de Carpa en la reproducción artificial de Pacú (*Piaractus mesopotamicus*). Instituto de Ictiología del Nordeste, Facultad de Ciencias Veterinarias – UNNE, Resumen: V-061, Argentina. p 1-3.
- Rodríguez-Olarte D. y C. Kossowski, 2004. Reproducción de peces y consideración de ambientes en eventos de crecidas en el río Portuguesa, Venezuela, *Bioagro* V.16 (2): 143-147. Barquisimeto, 2004.
- Uzcátegui S. 1991. Estudio de peces autóctonos con miras a la hipofización, *Veterinaria Tropical* 16: 29-41. 1991.
- Valencia O., N. Chaparro y E. Fadul 1985. Aplicaciones hormonales para la reproducción artificial de la Cachama Negra (*C. macropomum*), (Cuvier, 1818) y la Cachama (*C. bidens*) (Spix 1829). Estación de piscicultura de Repelón. *Inst. Rec. Nat. Ren. y del Medio Ambiente (INDEREMA)*.
- Venero J. y C. Kossowski. 2004. Reproducción en cautiverio, desarrollo temprano y cultivo de la Palambra (*Bruycon whitei*, Mayers y Weizman 1960, Teleostei, Characidae) *BioLlnia* 14 (15-23), 2004.
- Woynarovich E. 1986. Tambaqui y Pirapitinga Propagacao artificial e criaao de alevitos. *Prog. Nac. de Irrigacao. CODEVASF. Brasil.* p. 68.
- Woynarovich E. 1977. Propagación de los peces. Informe técnico N°. 72, Ministerio de Agricultura y Cría, Venezuela. p 1-46.