



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DEL TRATAMIENTO DE NUCLEOTIDOS
CICLICOS Y FACTORES LIBERADORES DE
GONADOTROFINAS SOBRE LA MADURACION
GONADAL DEL PEZ Xiphophorus hellerii (Heckel, 1848)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MARIA HILDA PIÑA VAZQUEZ

MEXICO, D. F.

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

INTRODUCCION -----	1
ANTECEDENTES -----	11
DESCRIPCION DE LA ESPECIE -----	15
OBJETIVOS -----	18
HIPOTESIS -----	19
MATERIAL Y METODO -----	20
RESULTADOS -----	26
DISCUSION Y CONCLUSIONES -----	50
BIBLIOGRAFIA -----	54

INTRODUCCION

El sistema nervioso y endócrino son altamente interdependientes y frecuentemente actúan juntos. Existe también interacción entre órganos sensoriales, sistema nervioso central y glándulas endócrinas cuando hay una respuesta fisiológica reproductiva.

La interacción de los componentes del sistema nervioso y endócrino es muy compleja y en peces, el problema es mayor por el extremado número de especies y las diversas adaptaciones a la gran variedad de habitats que ellos ocupan.

El sistema endócrino está presente en lampreas y pez bruja (Ciclostomata); más similar con vertebrados superiores aparece en los tiburones (Elasmobranquios) y en peces óseos (Osteichthyes). Sin embargo, las diferencias son considerables entre las glándulas endócrinas de peces y mamíferos. Esta diferencia puede ser correlacionada con diferencias en la evolución de otros sistemas en los dos grupos y con las exigencias de una existencia acuática.

Aunque la endocrinología de peces está avanzando, sólo algunos aspectos de las funciones de control hormonal en peces han sido investigadas.

La glándula hipófisis.

Esta glándula endócrina se encuentra en todos los vertebrados y se desarrolla embriológicamente de un elemento neural,

crece por debajo de la región del diencéfalo. Al mismo tiempo crece hacia arriba, desde la boca del embrión una bolsa del ectodermo llamada bolsa de Rathke. Nacen de estas dos estructuras embrionarias masas de tejido para formar la hipófisis.

Estos dos elementos de origen ectodérmico están rodeados por mesodermo; de ellos se desarrolla el futuro abastecedor sanguíneo de la hipófisis. Anterior a la glándula hipófisis descansa el quiasma óptico y posterior, el saco vasculoso. El infundíbulo conecta la glándula al piso del diencéfalo, simultáneamente, el orificio de la parte inferior del cerebro donde se aloja la glándula hace que ésta aparezca más pronunciada (Figura 1).

Anatomía e histología de la glándula.

La glándula pituitaria o hipófisis en peces consiste en una adenohipófisis de tres secciones funcionalmente distintas y de una neurohipófisis.

La división de la adenohipófisis en pro-, meso- y meta-adenohipófisis está basada en su relativa posición antero posterior y sobre los diferentes tipos de sus células secretoras. Estas divisiones de la adenohipófisis son equivalentes a la pars rostral, pars distal y pars intermedia respectivamente lo cual enfatiza su homología con la glándula de tetrápodos.

La porción posterior, meta-adenohipófisis, sostiene la delgada neurohipófisis y recibe procesos de células neurosecretoras hipotalámicas.

La glándula hipófisis de peces óseos superiores es más compacta que en lampreas y tiburones.

Las diferentes hormonas son secretadas por el tejido neurosecretor del hipotálamo y son acumuladas en la neurohipófisis de donde continúan su camino dentro del torrente sanguíneo. El control de la adenohipófisis parece, en parte estar basada en neurosecreciones (Figura 2).

Las hormonas hipofisiarias.

Muchas de las hormonas de la glándula hipofisis de los peces tienen los mismos efectos o efectos análogos que las glándulas de mamíferos que han sido mejor estudiadas. Las hormonas hipofisiarias son proteínas o polipéptidos y en muchos casos las preparaciones de mamíferos han sido usadas para establecer el papel de algunas de ellas en los peces.

Se han registrado diferencias en la composición química de la misma hormona en diferentes familias de mamíferos, es por lo tanto de esperarse que existan diferencias similares entre las hormonas de diferentes grupos de peces.

La especificidad de las hormonas hipofisiarias en peces ya ha sido demostrada en experimentos y aplicaciones prácticas con inyecciones e implantaciones para inducción al desove de varios peces de importancia económica como, esturión, trucha, pez gato y lisas.

Las hormonas hipofisiarias en peces se pueden dividir en dos grupos, uno de los cuales controla recíprocamente la función de otras glándulas endocrinas y otras que actúan seleccionando procesos enzimáticos en uno o varios tipos de cuerpos celulares. En el primer grupo están las adeno-corticotrópicas, la tirotrópica y las hormonas gonadotrópicas las cuales son secretadas por la pro- o meso-adenohipófisis de-

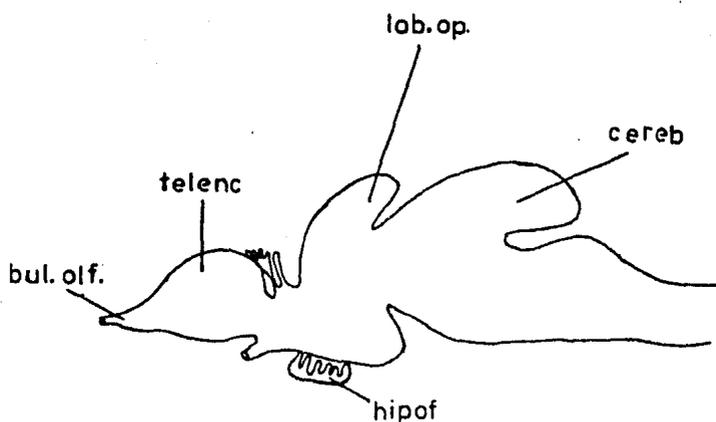


Figura 1. Vista lateral del cerebro de un pez teleosteo (Salmo gairdneri).
(Basado en Nieuwenhuis, 1982).

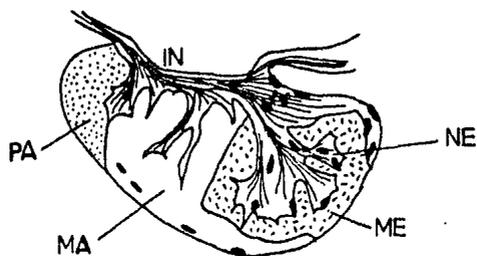


Figura 2. Glándula hipófisis de pez.
IN infundíbulo; MA, meso-adenohipófisis; ME, meta-adenohipófisis; NE neuro-hipófisis; PA, pro-adenohipófisis.
(Basado en Pickford y Metz, 1957)

pendiendo de la especie de pez. En el segundo grupo son varias hormonas que actúan sobre los melanóforos.

La acción de las gonadotrofinas sobre las gónadas.

La extirpación de la hipófisis (hipofisectomía) hecha en varias especies de peces reduce o detiene el desarrollo gonadal en la transición de juveniles a madurez sexual y durante el ciclo estacional de desove. La dependencia de la glándula hipófisis para la producción total de hormonas sexuales por las gónadas ha sido establecida en peces.

Recientes investigaciones se inclinan a favor de la existencia de una sola gonadotrofina en peces, se ha propuesto el término Gonadotrofina Pituitaria Piscina (PPG). Esta gonadotrofina en teleósteos posee propiedades que en los mamíferos están distribuidas entre dos hormonas, la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH). La LH de mamíferos promueve la liberación de gametos de gónadas cercanas a la madurez y estimula la aparición de características sexuales secundarias. Por esto se deduce que existe una hormona similar en peces.

En mamíferos las gonadotrofinas se producen en el lóbulo anterior de la hipófisis y son controladas por factores liberadores que son transportados desde el hipotálamo por el sistema porta-hipotalámico-hipofisiario la FSH y LH son secretadas por las células basófilas de la hipófisis (Figura 3).

La hipófisis anterior secreta tres hormonas proteínicas que tienen influencia en el sistema reproductor, estas hormonas gonadotrópicas son la FSH, la LH y la prolactina. Otras hormonas libera-

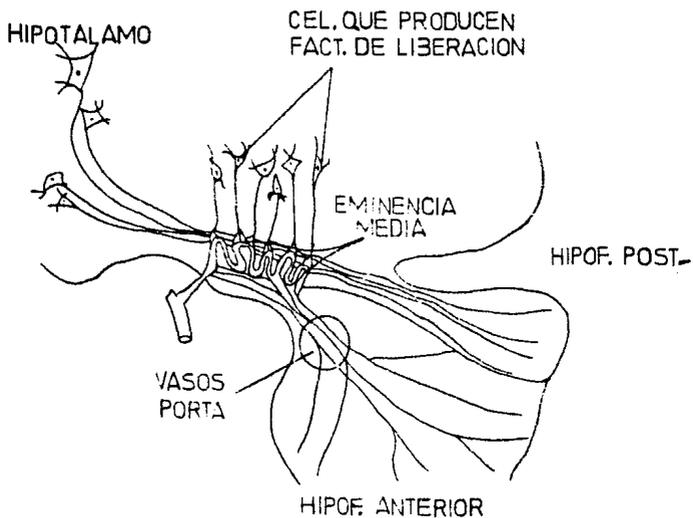


Figura 5. Diagrama para mostrar el control neurohumoral de la hipófisis anterior en la eminencia media del hipotálamo. La hipófisis anterior es controlada por factores liberadores que se producen en las neuronas del área hipofisotrófica del hipotálamo, que se liberan en el sistema portal.

radas por la hipófisis anterior como, la ACTH y la hormona estimulante de la tiroides (TSH) también influyen indirectamente en el sistema reproductor, pero no se pueden considerar como verdaderas hormonas reproductoras.

En la hembra, la FSH promueve el crecimiento y desarrollo de los folículos ováricos, se piensa que estimula el desarrollo de los folículos y que produce cambios bioquímicos como la síntesis de proteínas, especialmente en las células de la teca. En el macho la FSH estimula el crecimiento de los tubulos seminíferos, también es muy importante en las primeras fases de la espermatogénesis.

La LH tiene varias acciones diferentes en la hembra. Primero, estimula la síntesis de esteroides en todos los tipos de células del ovario (el cuerpo lúteo, la teca, la granulosa y las células intersticiales) y es probable que cierta concentración basal de LH sea necesaria para la síntesis de esteroides en el ovario. Además la LH induce la ovulación de los folículos previamente preparados con FSH.

En el macho, la LH estimula un aumento en la síntesis y en la secreción de la testosterona en las células de Leydig. El andrógeno que se produce es necesario para el desarrollo de los caracteres masculinos secundarios y para la maduración final de los espermatozoides.

El concepto de segundo mensajero.

El AMP cíclico y otros nucleótidos han sido establecidos como "segundos mensajeros intracelulares" mediando la acción de una variedad de diferentes hormonas siendo significativo desde el punto de vista de la reproducción y fertilidad.

Un gran número de hormonas producen, al menos algu-

nos de sus efectos por estimulación de adenil-ciclase, que cataliza la formación de AMP cíclico a partir de ATP.

El primer mensajero en este concepto es la hormona o neurohormona, la cual es liberada por estimulación de factores liberadores sintetizados en el hipotálamo (puede en algunos casos involucrar la participación de nucleótidos cíclicos). El primer mensajero viaja a sus células blanco a estimular la formación intracelular de un segundo mensajero, el cual entonces desencadena el trabajo real de la hormona. La hormona actúa en la adenil-ciclase ligada a la membrana de la célula efectora.

La hormona activa la adenil-ciclase que produce AMP cíclico a partir de ATP. A su vez el AMP cíclico activa las enzimas, cambia la permeabilidad de la membrana e incluso inicia la síntesis de proteínas según la célula u orgánulo celular involucrado (Figura 4).

El AMP cíclico es sin embargo sólo un segundo mensajero que ha sido establecido como tal, aunque es probable que otro (s) segundo mensajero sea descubierto.

De igual manera ha sido descrito el mecanismo de GMP cíclico, como un mensajero intracelular que induce la división celular y limita la diferenciación mientras que el AMP cíclico inhibe la división y promueve la diferenciación celular (Lehninger, 1980).

Ovario.

Los ovarios en peces, al igual que los testículos, son, usualmente longitudinales y originados como estructuras pareadas, pero en ocasiones se funden y se acortan. Están suspendidos desde lo alto sobre un lado de la cavidad del cuerpo por un par de mesenterios (me-

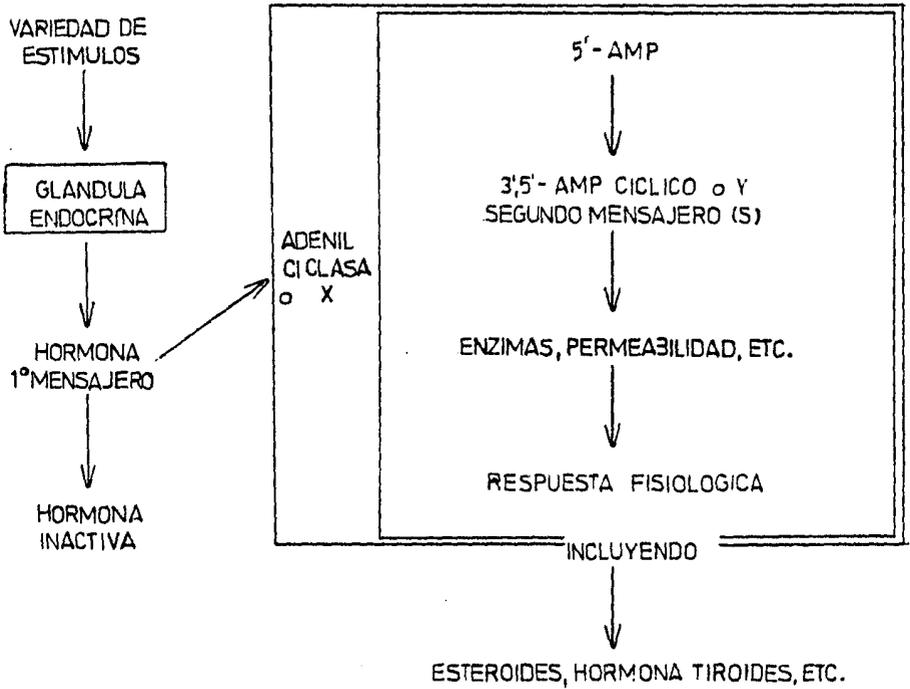


Figura 4. Representación esquemática del concepto de segundo mensajero. De Sutherland y Robison (1966).

suario) y típicamente situado debajo de la vejiga natatoria, si se presenta.

El tamaño y extensión que ocupan en la cavidad del cuerpo varía con el estado de madurez sexual de la hembra. Cuando está maduro puede constituir el 70 % del peso del cuerpo. El color varía, los rangos más frecuentes son desde el blanco en organismos jóvenes hasta el grisáceo en inmaduros a amarillo oro (color del vitelo) en adultos maduros. El rango de textura del órgano va desde el floculado hasta el microscópicamente granular, en juveniles, a granular grueso, variando la talla de huevos individuales en adultos.

En teleosteos vivíparos es un complejo órgano hueco donde se producen huevos, se almacena esperma, sirve como sitio de fertilización intrafolicular y suministra alimento para el desarrollo de los embriones.

A N T E C E D E N T E S

En años recientes se han realizado numerosas investigaciones para conocer el control neuroendócrino de la reproducción en peces teleósteos, ya que es de suma importancia desde el punto de vista de su posible aplicación en el cultivo de peces.

El eje Hipotálamo-hipófisis-gónada ha sido establecido como el centro neuroendócrino de la reproducción en peces al igual que en otros vertebrados (Schulz et al., 1981). Para la inducción artificial de la gametogénesis, vitelogénesis, maduración gonadal y mantenimiento de la gestación se han empleado diversas sustancias; hormona gonadotrófica (GTH) y hormona luteinizante (LH) de mamífero, GTH de salmón, gonadotrofina coriónica humana (HCG), tiroxina, andrógenos, extractos hipofisarios de peces, adrenalina y prolactina.

También se han efectuado estudios in vitro induciendo la maduración de ovocitos y maduración folicular de S. gairdneri con metabolitos de progesterona. De la misma manera se han empleado productos sintéticos que aceleran algunos estadíos del ciclo reproductor, entre ellos están, el citrato de clomifeno y acetato de cobre que inducen ovulación, aceleran la maduración del óvulo e incrementan la vitelogénesis respectivamente (Fontaine, 1976).

Otros productos de uso potencial como agentes ovulatorios o de desove en el cultivo de peces son, el factor liberador de la hormona luteinizante (LH-RH) sintético y sus análogos, que inducen la se cre cción de gonadotrofinas en teleósteos (Lam, 1982). Sokolowska et al.

(1978) reporta que la inyección intrahipofisial de LH/FSH-RH sintético (1 µg/kg de peso corporal) estimula la maduración ovárica en carpas.

Otros compuestos que desempeñan un papel clave en la acción bioquímica de varias hormonas son los nucleótidos cíclicos, adenosin monofosfato cíclico (AMP cíclico) y el guanosin monofosfato cíclico, a los cuales Sutherland y sus colaboradores (1966) asignan el papel de segundos mensajeros intracelulares; relacionándolos con un control hormonal hipotalámico que induce la liberación de hormonas de la hipófisis anterior (Cheung, 1970; Ratner, 1970; Steiner et al., 1970; Austin y Short, 1972; Pastan, 1972; Ratner et al., 1976; Gordon et al., 1979).

Aplicando diferentes dosis de AMP cíclico se observó que la carga adrenal y la capacidad esteroidogénica en ratas hipofisectomizadas pudo ser mantenida, asimismo se registraron cambios uterinos semejantes a los producidos por tratamiento de estrógenos (Robison, 1970), estimulando la producción de AMP cíclico resulta en un incremento en la liberación de hormonas. Ratner (1970) sugiere que el AMP cíclico interviene en la acción del LH-RH sobre la liberación de LH, ya que la administración exógena de AMP cíclico acelera la liberación de LH en ratas, el mismo autor postula que el AMP cíclico puede ser un mediador de la liberación de una variedad de hormonas hipofisarias.

Otros estudios realizados por Spruill y Steiner (1976) en ratas, asocian a los nucleótidos cíclicos, eventos celulares dependientes de la maduración testicular y su participación en la espermatogénesis. Se sugiere en general, que el AMP cíclico desempeña un papel importante en la reproducción (Robison, 1970).

El papel del GMP cíclico es menos claro, aunque tan

bién puede desempeñar un papel importante en la regulación de eventos celulares como, la mediación de la secreción de hormona de crecimiento (GH) en ratas (Latner, 1976).

Estudios con ovocitos de rana (Rana pipiens) demostraron que el AMP cíclico inhibe la síntesis de progesterona induciendo la maduración de ovocitos (Mulner et al., 1979). Otros datos demuestran una disminución significativa en los niveles de AMP cíclico y GMP cíclico en progesterona. Se ha aplicado este concepto a la regulación de la división celular (Speaker y Butcher, 1977).

El AMP cíclico también ha sido reportado como un activador de la motilidad en los espermatozoides de erizos de mar (Masaki y Okumo, 1982).

Los primeros trabajos hechos en peces (S. cairdneri) son los de Schulz et al. (1981) donde menciona al AMP cíclico como un mediador intracelular de la acción de hormonas hipotalámicas en gónadas y establece que en peces teleosteos, las hormonas gonadotróficas de la hipófisis desarrollan su actividad biológica a través de la concentración intracelular de AMP cíclico en sus órganos blanco. En otros estudios realizados por Schulz y Blum (1982) se ha registrado una disminución en los niveles de AMP cíclico testicular al iniciar la espermatogénesis en Salmo cairdneri . seguida de un incremento que coincide con la aparición de las espermátidas, más adelante el desarrollo es acompañado por niveles basales de AMP cíclico en el que vuelve a mostrar un incremento, en contraste con los niveles de GMP cíclico que aumenta en relación al desarrollo testicular, en hembras, los niveles de GMP cíclico aumentan conforme avanza el desarrollo y maduración de los ovocitos. Los niveles de AMP cíclico tienen su máxima concentración al principio de la ovogéne

sis, al final de la misma se registra un aumento del nucleótido que coincide con la síntesis de estrógenos ováricos y la vitelogénesis.

Sobre el ciclo ovárico de Xiphophorus hellerii sólo dos trabajos han sido reportados. Uno realizado por Bailey en 1943 donde describe morfológicamente el tracto genital de la hembra, la evolución de los folículos y cambios en el epitelio folicular así como la preñez. El otro por Azevedo, 1974 quien describe la evolución de las membranas ovocitarias en el curso de la ovogénesis, describe además ocho estadios a través de los cuales la dimensión de las ovogonias es de 25μ alcanzando un diámetro de 1800μ en un ovocito totalmente maduro.

Lambert (1970) en un trabajo realizado con el teleosteo vivíparo Poecilia reticulata también describe ocho estadios en el transcurso de la ovogénesis y crecimiento folicular. Reporta diámetros de los ovocitos similares a los reportados por Azevedo, además describe cambios en el núcleo, citoplasma y capa folicular en el transcurso de la maduración ovárica.

Durante las últimas décadas numerosas investigaciones se han enfocado al control endócrino de la reproducción en peces. La aplicación de estos conocimientos ha reportado resultados significativos en países desarrollados, por consiguiente la introducción de esta tecnología en centros piscícolas del país podría incrementar la producción de las especies susceptibles de cultivo. Por lo tanto es de vital importancia conocer la neuroanatomía e histología de todos los elementos que participan en el control neuroendócrino de la reproducción, incluyendo el sistema sintetizador de factores liberadores de gonadotropinas y el concepto de segundo mensajero, en los que se basa este trabajo.

DESCRIPCION DE LA ESPECIE

Los géneros de la familia Poeciliidae son peces pequeños, las especies que más se desarrollan llegan a alcanzar 200 mm de longitud total. Son de fecundación interna y su mayoría vivíparos.

Los peces de esta familia pueden ser diferenciados de otros grupos porque los machos presentan una modificación de la aleta anal en un órgano copulador intromitente o gonopodio, que puede rotar y flexionarse en conjunto con una de las aletas pélvicas y acompañado por una curvatura asimétrica en "S" del cuerpo, que se incrementa en X. hellerii cuando las hembras están presentes, pero no es un requisito para que ocurra la cópula (Kallman y Borowsky, 1972).

Existe un marcado dimorfismo sexual, las hembras son siempre de talla mayor que los machos, los cuales presentan una coloración más intensa y el desarrollo de la cola de espada.

El período de vida es de aproximadamente tres años. El número de crías es muy variable dependiendo de la especie, el tamaño de la hembra y de la alimentación, las de mayor talla llegan a tener hasta 150 crías por camada. En condiciones naturales en invierno no se reproducen.

Los miembros del género Xiphophorus habitan las regiones situadas en las latitudes tropicales y templadas tanto en aguas dulces como en aguas saladas. Son endémicos del Sureste de México y partes adyacente de América Central (Kallman y Atz, 1966; Kallman, 1968)

(Figura 5).

El género Xiphophorus provee de un excelente material biológico para el estudio de procesos evolutivos y de varios niveles taxonómicos, porque una gran variedad de caracteres pueden ser analizados genéticamente tales como, patrones de pigmentación, determinación del sexo, comportamiento y características gonopodiales (Fallman, 1971).

Xiphophorus hellerii (Heckel, 1849) es conocido como "cola de espada" por la proyección que presentan los machos en el lóbulo inferior de la aleta caudal. Fallman y Atz (1966) reportan cuatro subespecies, X. h. hellerii, X. h. stricatus, X. h. quenterei, X. h. alvarezii.

Llegan a alcanzar una talla de 80 mm los machos y 100 mm las hembras, desde el borde anterior de la boca a la base de la cola. La forma del cuerpo es comprimida, con un pedúnculo caudal muy ancho. Su tipo de alimentación es omnívora. Su peso es de 2 a 4 gr en estado adulto. Xiphophorus hellerii es considerado como un pez vivíparo (Bailey, 1943; Kamrin y Arosón, 1954; Pickford y Atz, 1957; Aries, 1972; Azevedo, 1974; Jhonas-Davis et al., 1983; Ucci, 1972).

La madurez sexual se inicia a las 10.4 semanas de edad (Bao, 1952) alcanzándose en su totalidad de la 27 a la 33ª semana; en los machos la maduración sexual se relaciona externamente con el desarrollo del gonopodio. El período de gestación es de 4 a 6 semanas, el número de crías es de 20 a 150 por camada.

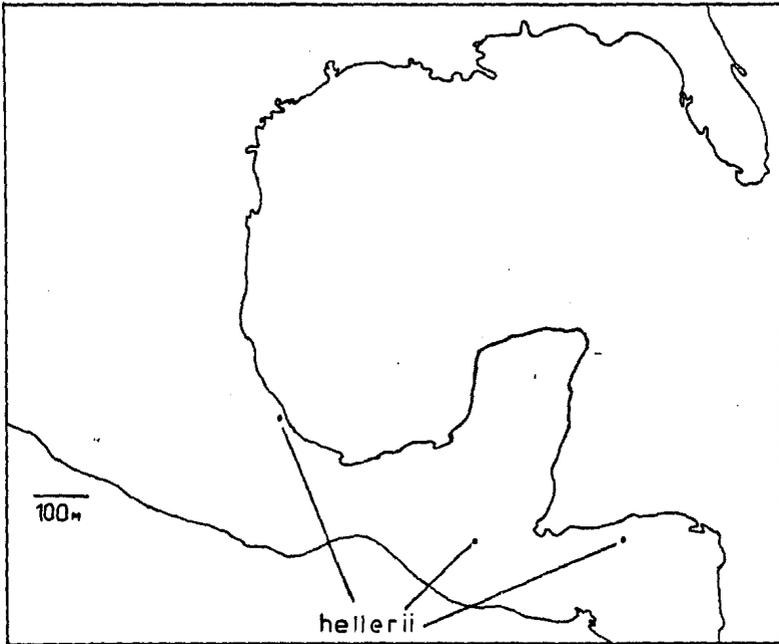


Figura 5. La distribución de *Xiphophorus* (Basada principalmente en Rosen, 1960). *Xiphophorus hellerii*, tres de las cuatro subespecies tienen una amplia distribución. *X. hellerii alvarezii*, el cual es conocido solamente por el río Santo Domingo, un tributario del río Usumacinta en el Estado de Chiapas, México. (Kallman, K.J. y J.W. Atz, 1966).

OBJETIVOS

Contribuir al conocimiento de la participación de los nucleótidos cíclicos sobre la síntesis de hormonas hipofisiarias.

Observar los efectos de la administración intrahipofisial de nucleótidos cíclicos sobre la maduración gonadal de Xiphophorus hellerii.

Valorar morfológica e histológicamente los efectos de la administración exógena de nucleótidos cíclicos sobre los procesos de maduración gonadal en vivo de peces juveniles de X. hellerii.

HIPOTESIS

Los nucleótidos cíclicos actúan como segundos mensajeros en la síntesis de proteínas y factores liberadores de hormonas gonadotróficas. Un tratamiento prolongado de dibutilil 3',5'-adenosin monofosfato cíclico (AMP cíclico) o dibutilil 3',5'-guanosin monofosfato cíclico (GMP cíclico) acelera la maduración gonadal en peces juveniles de Xiphophorus hellerii, induciendo ovogénesis y maduración folicular.

MATERIAL Y METODO

Se emplearon 75 peces juveniles Xiphophorus hellerii de 8 a 9 semanas de edad divididos en cuatro grupos. Los organismos se mantuvieron en un acuario de 60 cm de largo x 40 cm de ancho x 33 cm de alto, dividido en cuatro secciones con una malla de 2 mm de apertura. En dos de las secciones se colocaron los grupos experimentales (20 organismos en cada uno) y los grupos testigo en las secciones restantes, 20 para tratarlos con LH-RH y 15 con agua destilada (Figura 6).

Todos los grupos se mantuvieron bajo las mismas condiciones ambientales. El acuario contenía aproximadamente 60 l de agua de clorinizada y filtro biológico. La temperatura se mantuvo en un intervalo de 25°C a 27°C con un termostato eléctrico, el pH osciló entre 7 y 7.2. El fotoperíodo se ajustó en 12 h luz y 12 h de obscuridad.

La alimentación de los peces fué ad libitum dos veces al día con cereal mixto seco (harina de pescado, harina de camarón, hígado de res, huevo, gluten de trigo, algas marinas y pulpa de caracol). Antes de iniciar el tratamiento los peces fueron aclimatados durante 15 días.

Las dosis de db-AMP cíclico, db-GMP cíclico, LH-RH sintético y agua destilada fueron aplicados exógenamente por medio de una inyección intrahipofisial a través de la fosa ocular, con una jeringa Hamilton de 10 μ l para cada lote. El 3',5'-dibutiril adenosin monofosfato cíclico (db-AMP cíclico) sintético (lab. SIGMA U.S.A.) y el

3',5'-dibutiril guanosin monofosfato cíclico (db-GMP cíclico) sintético (Lab. SIGMA U.S.A.) fueron aplicados en solución, 100 µg/5µl de agua destilada. A cada pez se le aplicó una dosis de 4 µg/2 µl de la solución preparada, dos veces por semana durante 5 semanas. El LH-RH sintético (Lab. Hoechst Frankfurt) fué aplicado como se presenta en la ampollita a una dosis de 0.2 µg/2 µl. El otro grupo control recibió el mismo volumen de agua destilada, ambos grupos fueron inyectados por vía intrahipofisial.

Antes de aplicar la inyección los peces fueron anestesiados con tricaina-ethyl-m-aminobenzoato (YS 222), 70 mg/100 ml de agua durante un tiempo promedio de 50 segundos por organismo.

Para aplicar la inyección los peces se envolvieron en una gasahúmeda y con la ayuda de un microscopio quirúrgico se diseñó la conjuntiva ocular para retraer el globo ocular fuera de la cavidad orbitaria, manteniéndolo expuesto con la ayuda de pinzas de disección, sin manipular o lesionar el nervio óptico. La ubicación anatómica de la hipófisis, teniendo como referencia la cavidad orbitaria, es la región más profunda de la mencionada cavidad, infero-posterior a la emergencia del nervio óptico en cuya región se insertan algunos músculos y tejido conjuntivo. La inyección de los nucleótidos cíclicos, LH-RH y el agua destilada se llevó a cabo introduciendo la punta de la aguja hipodérmica a través de la pared cartilaginosa, aplicando el contenido directamente sobre la glándula. Una vez aplicada la inyección se retiró suavemente la jeringa permitiendo que el globo ocular regresara a su posición original.

Después del tratamiento cada organismo se pesó, se midió y posteriormente se incorporó al acuario observándose hasta que diera muestras de recuperación (1-3 minutos).

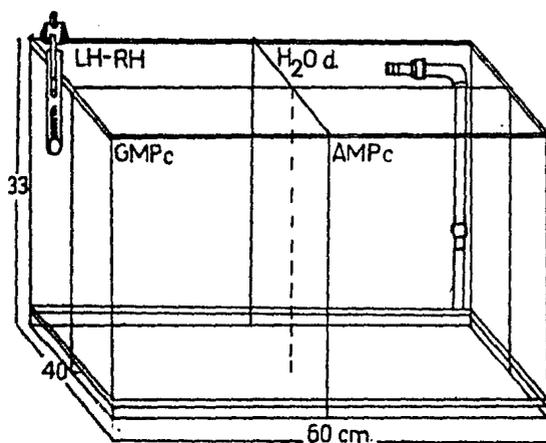


Figura 6. Pecera subdividida en cuatro lotes. Los grupos experimentales y control fueron mantenidos bajo las mismas condiciones ambientales.

Al término del experimento los organismos fueron sacrificados por decapitación bajo anestesia profunda, para efectuar las valoraciones histológicas se procesaron de la siguiente manera:

Los cuerpos y las cabezas se colocaron en frascos individuales en solución de Bouin por 24 horas para su fijación. Posteriormente se colocaron en alcohol al 50 % por 24 h. y en alcohol al 70 % también por 24 horas. Después de este período se procedió a la decalcificación, con una solución de Citrato de Sodio al 20 % y ácido fórmico al 50 % durante dos semanas haciendo un cambio de descalcificador cada tercer día. Al término de este proceso las muestras fueron encapsuladas y lavadas en agua corriente durante 48 h. Las gónadas se separaron del cuerpo, se lavaron y pasaron al Histoquick para su deshidratación, aclaramiento (impregnación con un disolvente de la parafina) e impregnación con parafina. Las gónadas se incluyeron en parafina. Se hicieron cortes sagitales en serie de 6 micras de grosor.

La técnica de tinción empleada fué la de Hematoxilina-Eosina (HE) (Armed Forces Institute of Pathology, 1957).

Para hacer la valoración cuantitativa se procedió a amplificar y esquematizar las imágenes de las gónadas (3 cortes por organismo) con la ayuda de un microproyector Ken-A-Vision. Una vez obtenida la imagen se midió el diámetro de los ovocitos para determinar su estadio de maduración, de acuerdo a Azevedo (1974) (Figura 7).

Para hacer la valoración cuantitativa se empleó la prueba de U de Mann-Whitney (Siegel, 1978) y la desviación estándar del número promedio de ovocitos observados por estadio de maduración en cada grupo.

Las muestras también fueron analizadas cualitativa-
mente considerando los criterios de Bailey, 1943 y Lambert, 1970.

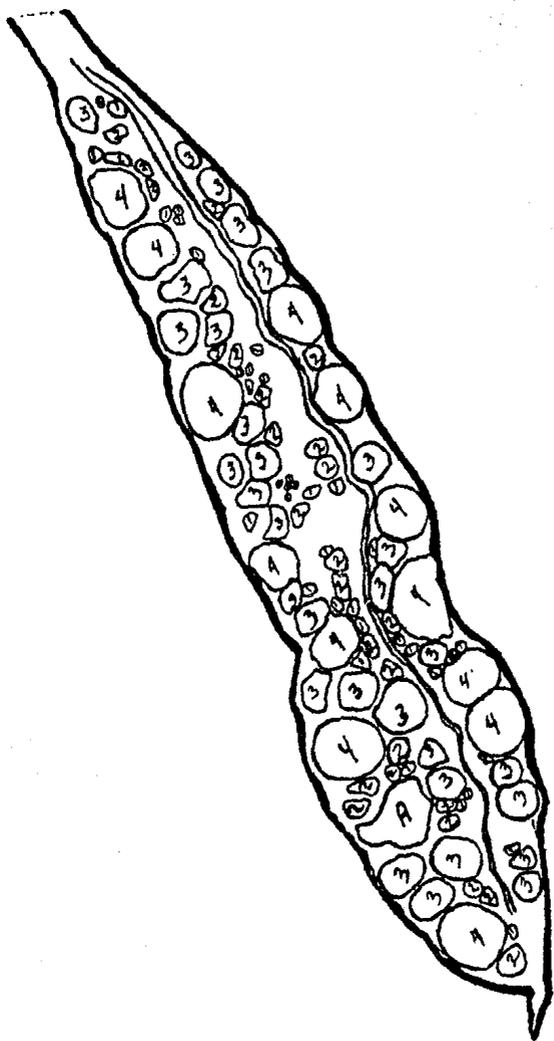


Figura 7. Esquema de la gónada de un pez juvenil X. hellerii.
 Se midieron los diámetros y cuantificaron los ovocitos en los diferentes estadios de maduración, (1, ovocito atrésico I, 2, 3, 4 estadios de maduración).
 Longitud real de la gónada 2700 μ .

RESULTADOS

Descripción histológica del desarrollo ovocitario normal de peces juveniles Xiphophorus hellerii. Se describen cuatro de los ocho estadios propuestos por Lambert, 1970 y Azevedo, 1974. En los grupos control y grupos experimentales el desarrollo ovocitario registró hasta el IV estadio de maduración

Estadio I Cromatina-nucleolos (Lámina 1, Figura 2)

Ovogonias de 25-40 μ de diámetro en forma globular organizadas en grupos de 4-5 células rodeadas por tejido conjuntivo formando pequeños cordones adyacentes al lumen ovárico. Con un núcleo basófilo ligeramente ovoide de 14-16 μ aproximadamente que ocupa la mayor parte de la célula, con un nucleolo prominente y hebras de cromatina bien organizadas. El citoplasma agranular ocupa el 30 % del volumen total de la célula. Pueden observarse algunas células foliculares al rededor de la ovogonia. Se encuentra en profase meiótica, rodeadas por tejido conjuntivo y ovogonias.

Estadio II Peri-nucleolos I (Lámina 1, Figura 3)

Ovocitos de 40-70 μ ligeramente ovoides. Con un núcleo basófilo ligeramente ovoide, su diámetro se ha incrementado considerablemente 20-24 μ . El número de nucleolos se ha incrementado, uno de ellos es prominente y desplazado hacia la periferia del núcleo. Las he-

bras de cromatina se encuentran organizadas. La cantidad de citoplasma es aproximadamente el 50 % del volumen total de la célula, basófilo y de textura granular gruesa. Una capa continua de células foliculares rodea al ovocito formando un epitelio folicular. Se encuentra en profase meiótica. Rodeado por tejido conjuntivo y ovocitos diferente estadio de maduración.

Estadio III Peri-nucleolos II (Lámina 2, Figura 4,5)

Ovocitos de 70-140 μ de diámetro en forma globular. Con un núcleo basófilo ovoide de 35-45 μ de diámetro aproximadamente, desplazado hacia la periferia. El número de nucleolos de ha incrementado considerablemente, el núcleo presenta apariencia granular con la membrana nuclear claramente definida. El citoplasma es eosinófilo con apariencia finamente granular. En el perinúcleo se sintetizan numerosas gotas de lípido. En la capa folicular se pueden distinguir dos capas de células foliculares que empiezan a diferenciarse en una teca externa y una granulosa interna. En profase meiótica, rodeado por tejido conjuntivo y ovocitos en diferente estadio de maduración.

Estadio IV Gotas de lípido (Lámina 2, Figura 6,7)

El diámetro del ovocito es de 140-230 μ de forma globular. Con un núcleo basófilo ovoide de 65-80 μ de diámetro, desplazado hacia la periferia. El número de nucleolos se incrementa considerablemente, con un nucleolo prominente desplazado hacia la periferia. Las hebras de cromatina están organizadas. La textura del núcleo es granular con su membrana bien definida. El citoplasma eosinófilo ocupa el 40 % del volumen de la célula con textura finamente granular. Las gotas de lípido

pido se incrementan en número y se distribuyen por todo el citoplasma. Pequeñas gotas de vitelo empiezan a sintetizarse en la parte más externa del citoplasma. En la capa folicular se distinguen, una capa externa de células planas que corresponde a la teca y una capa de células cuboidales internas o células de la granulosa que dan la apariencia de formar pliegues radiados en su superficie interna. Se define el corión dando la apariencia de estar adherido a la superficie interna de la granulosa y formar pliegues entre ésta. En profase meiótica. Rodeado por tejido conjuntivo y ovocitos en diferente estadio de maduración.

Cuerpo Atrésico

(Lámina 2, Figura 5,9)

Los diámetros de los cuerpos atrésicos son variables de forma irregular. No se aprecia núcleo. El citoplasma con afinidad a los colorantes básicos de textura granular gruesa. Se desorganiza la capa folicular, las células de la granulosa invaden el citoplasma. No se aprecian las células de la teca.

Descripción histológica del desarrollo ovocitario de peces juveniles de Xiphophorus hellerii tratados con AMP cíclico en dosis de 4 ug/5er día/5 semanas. Se describe sólo el IV estadio, los estadios anteriores (I,II,III,IV) no mostraron diferencias histológicas significativas con respecto al grupo tratado con agua destilada.

Estadio IV Gotas de lípido (Lámina 3, Figura 11,12)

El diámetro del ovocito es de 140-230 μ de forma globular. Con un núcleo basófilo ligeramente ovoide de 65-80 μ de diámetro desplazado hacia la periferia de la célula. Se incrementa el número de nucleolos, con un nucleolo prominente desplazado hacia la periferia, las hebras de cromatina están bien organizadas. La textura del núcleo es granular con su membrana bien definida. El citoplasma eosinófilo finamente granular ocupa la mayor parte del volumen total de la célula, las gotas de lípido se incrementan en número y se distribuyen por todo el citoplasma. Se inicia la síntesis de vitelo en pequeñas gotas localizadas en la periferia del citoplasma. En la capa folicular están bien diferenciadas externamente las células planas de la teca e internamente las células cuboidales de la granulosa, su organización da la apariencia de formar pliegues radiados hacia la superficie interna de ésta. El corión se define claramente dando la apariencia de estar adherido a la superficie y formar pliegues entre ésta. Se encuentra en profase meiótica, rodeada de tejido conjuntivo y ovocitos en diferente estadio de maduración.

La actividad citoplásmica y folicular es ligeramente mayor que en grupo tratado con agua destilada.

Descripción histológica del desarrollo ovocitario de peces juveniles de Xiphophorus hellerii tratados con GMP cíclico en dosis de 4 µg/3er día/5 semanas. Se describe sólo el IV estadio, los estadios anteriores (I,II,III) no mostraron diferencias histológicas significativas con respecto al grupo tratado con agua destilada.

Estadio IV Gotas de lípido (Lámina 4, Figura 14,15)

El diámetro de los ovocitos es de 140-230 µ con forma generalmente globular, algunos con forma irregular probablemente por el poco espacio disponible. Con un núcleo ligeramente ovoide de 65-80 µ de diámetro. Se incrementa el número de nucleolos. Las hebras de cromatina se encuentran bien organizadas. El núcleo presenta una textura finamente granular con su membrana bien definida. El citoplasma es eosinófilo con textura granular fina, ocupa la mayor parte del volumen total de la célula. Con abundantes gotas de lípido en la periferia del citoplasma y en menor cantidad en el resto de éste. No se ha iniciado aún la síntesis de vitelo. En la capa folicular se observan dos capas de células planas sin diferenciarse en células de la teca y granulosa. Se encuentra en profase meiótica. Rodeado por tejido conjuntivo y ovocitos en diferente estadio de maduración.

A nivel citoplásmica y folicular la actividad es prácticamente nula. No se ha iniciado la síntesis de vitelo, las gotas de lípido no se han distribuido por todo el citoplasma y la capa folicular no se ha diferenciado claramente en teca y granulosa.

Descripción histológica del desarrollo ovocitario de peces juveniles de Xiphophorus hellerii tratados con LH-RH sintético en un volumen de 2 μ l/3er día/5 semanas. Se describe sólo el IV estadio, los estadios anteriores (I,II,III) no mostraron diferencias histológicas significativas con respecto al grupo tratado con agua destilada.

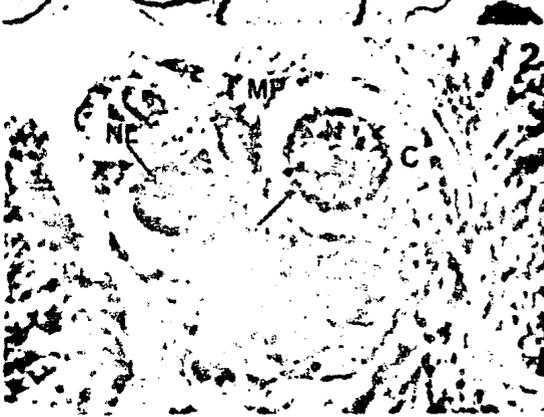
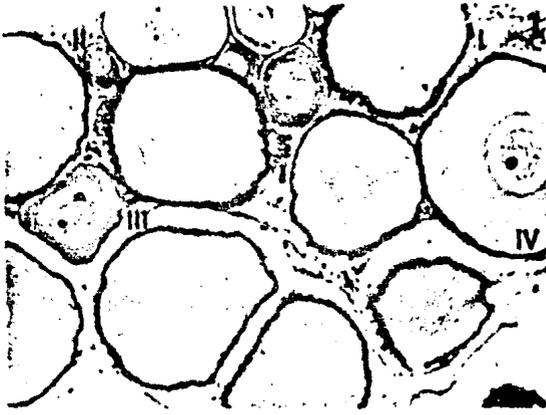
Estadio IV Gotas de lípido (Lámina 5, Figura 17,18)

El diámetro de los ovocitos es de 140-230 μ de forma globular. Con un núcleo basófilo ligeramente ovoide de 65-80 μ de diámetro desplazado ligeramente hacia la periferia. Se incrementa el número de nucleolos. Las hebras de cromatina están bien organizadas. El núcleo presenta una textura finamente granular, con su membrana bien definida. El citoplasma ocupa la mayor parte del volumen de la célula, las grandes gotas de lípido ya se han distribuido por todo el citoplasma, en la periferia se aprecian pequeñas gotas de vitelo que han empezado a sintetizarse. La capa folicular está perfectamente diferenciada, externamente en células planas de la teca, internamente las células cuboidales de la granulosa. Se organiza dando la apariencia de formar pliegues radiados hacia la superficie interna de ésta. El corión está claramente definido dando la apariencia de estar adherido a la superficie interna de la granulosa y formar pliegues entre ésta. Se encuentra en profase meiótica. Rodeado por tejido conjuntivo y ovocitos en diferente estadio de maduración.

La actividad citoplásmica y folicular es muy pronun-
ciada. Las gotas de lípido se extienden por todo el citoplasma, su sín-
tesis es muy activa, la síntesis de vitelo se ha iniciado y el desarro-
llo de la capa folicular es muy activo.

TERMINOLOGIA UTILIZADA EN LAS LAMINAS

A	Cuerpo Atrésico
C	Citoplasma
CF	Capa Folicular
CO	Corión
EF	Epitelio Folicular
G	Granulosa
L	Gotas de Lípido
LU	Lumen Ovárico
MN	Membrana Nuclear
MP	Membrana Plasmática
N	Núcleo
NL	Nucleolo
T	Teca
VT	Vitelo
I,II,III,IV	estadios de maduración ovocítica



LAMINA 1

Lámina 1 Desarrollo ovocitario normal del pez X. hellerii.

Figura 1.- Aspecto general de la gónada de un pez juvenil (16X)

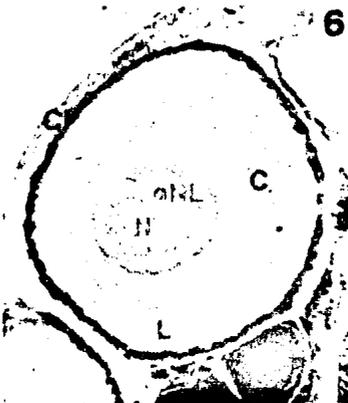
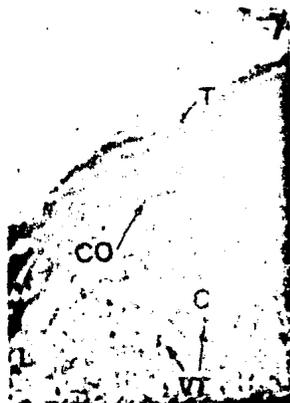
Los ovocitos se presentan simultáneamente en diferentes estadios de maduración.

Figura 2.- Estadio I Cromatina-nucleolos (100X)

Las ovogonias tienen un diámetro de 25-40 μ . Se encuentran organizadas en grupos formando cordones adyacentes al lumen ovárico.

Figura 3.- Estadio II Peri-nucleolos (100X)

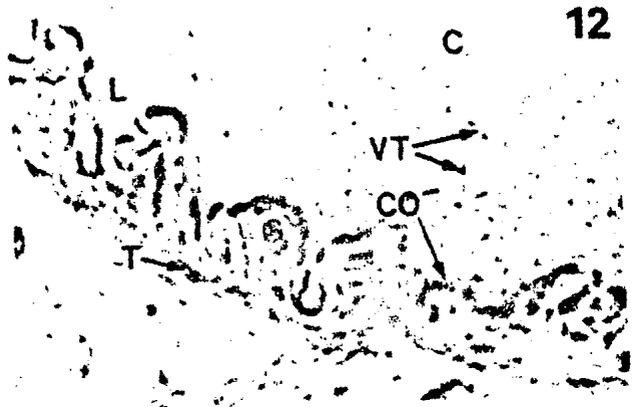
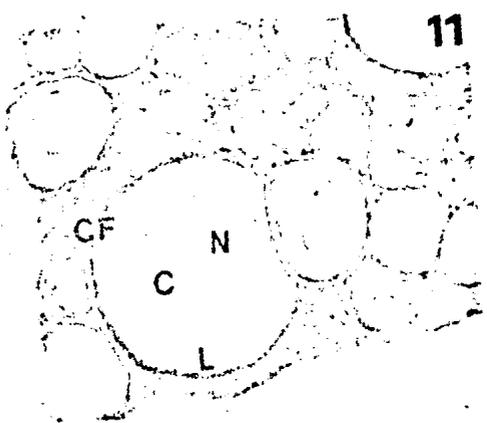
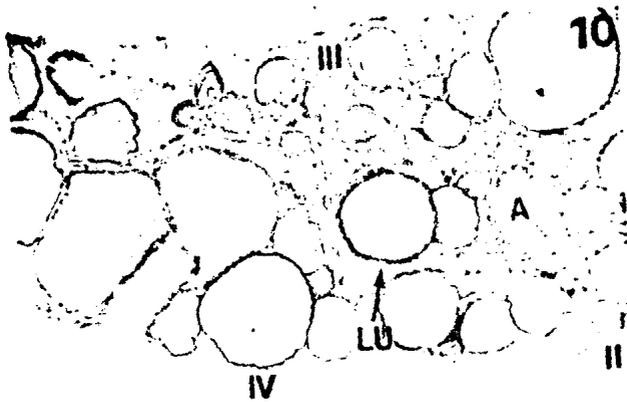
El diámetro del ovocito se incrementa considerablemente a 57 μ . Se rodea de un epitelio folicular. En éste y los subsecuentes estadios se incrementa la actividad y el diámetro nuclear.



LAMINA 2

Lámina 2 Desarrollo ovocitario normal del pez X. hellerii.

- Figura 4.- Estadio III Peri-nucleolos II (16X)
El diámetro del ovocito es de 105 μ . Se inicia la síntesis de gotas de lípidos en el perinucleo. La capa folicular empieza a diferenciarse.
- Figura 5.- Amplificación de la capa folicular del estadio III (100X)
La capa folicular está subdividida en una teca externa y una granulosa interna, ambas formadas de células planas.
- Figura 6.- Estadio IV Gotas de Lípido (16X)
El diámetro del ovocito es de 162 μ . Las gotas de lípido aumentan en número y se distribuyen en todo el citoplasma. Se inicia la síntesis de vitelo en la parte más externa del citoplasma. La capa folicular está diferenciada.
- Figura 7.- Amplificación de la capa folicular del estadio IV (100X)
La capa folicular está diferenciada, las células de la granulosa adquieren forma cuboidal, dan la apariencia de formar pliegues rediados. Las células de la teca conservan la forma plana. El corión da la apariencia de estar adherido a la superficie interna de la granulosa.
- Figura 8.- Ovocito atrésico (16X)
El diámetro de los ovocitos atrésicos es variable y de forma irregular. Las células de la granulosa se desorganizan e invaden el citoplasma.
- Figura 9.- Amplificación de la capa folicular del ovocito atrésico (40X)
Las células de la granulosa se encuentran desorganizadas. No se aprecian las células de la teca. El citoplasma adquiere una textura granular gruesa.



LAMINA 3

Lámina 3 Desarrollo ovocitario del pez X. hellerii tratado con AMP cíclico (4 μg /3er día/5 semanas).

Figura 10.- Aspecto general de la gónada de un pez juvenil tratado con AMP cíclico (6.3X).

Los ovocitos se presentan simultáneamente en diferentes estadios de maduración. Se aprecia el lumen ovárico desarrollado.

Figura 11.- Estadio IV Gotas de lípido (6.3X)

El diámetro del ovocito es de 200 μ . Las gotas de lípido se distribuyen por todo el citoplasma. Se ha iniciado la síntesis de vitelo. Hay una clara diferenciación de la capa folicular en teca y granulosa. Se aprecia el corión.

Figura 12.- Amplificación de la capa folicular del estadio IV (100X)

La capa folicular está claramente diferenciada. Las células adquieren forma cuboidal dan la apariencia de formar pliegues radiados en su superficie interna. Las células de la teca mantienen su forma plana. El corión da la apariencia de estar adherido a la superficie interna de la granulosa y formar pliegues entre ésta.



Lámina 4 Desarrollo ovocitario del pez X. hellerii tratado con GMP cíclico (4 µg/3er día/5 semanas).

Figura 13.- Aspecto general de la gónada de un pez juvenil tratado con GMP cíclico (16X).

Los ovocitos se presentan simultáneamente en diferentes estadios de maduración. Se aprecian cuerpos atrésicos. Con el lumen ovárico desarrollado.

Figura 14.- Estadio IV Gotas de Lípido (16X)

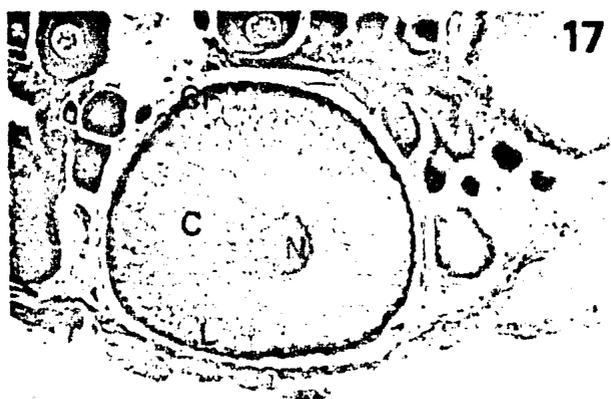
El diámetro del ovocito es de 189 µ. Se aprecian pequeñas gotas de lípido por todo el citoplasma. No se observan las gotas de vitelo características de éste estadio. No hay diferenciación en la capa folicular; no se aprecia el corión.

Figura 15.- Amplificación de la capa folicular del estadio IV (100X)

La capa folicular no está diferenciada en granulosa y teca. Ambas conservan la forma plana observada en el estadio III. No se aprecia el corión.



16



17



18

LAMINA 5

Lámina 5 Desarrollo ovocitario del pez *X. hellerii* tratado con LH-RH sintético (2 μ l/5er día/5 semanas).

Figura 16.- Aspecto general de la gónada de un pez juvenil tratado con LH-RH sintético (6.3X)

Los ovocitos se presentan simultáneamente en diferentes estadios de maduración. Se aprecia el lumen ovárico.

Figura 17.- Estadio IV Gotas de Lípido (6.3X)

El diámetro del ovocito es de 225 μ . La síntesis de lípidos es muy activa, las gotas se han distribuido por todo el citoplasma.

Figura 18.- Amplificación de la capa folicular del estadio IV (40X)

La capa folicular se encuentra claramente diferenciada. Las células de la granulosa han adquirido forma cuboidal e incrementan su tamaño. La organización de las células da la apariencia de formar pliegues radiados. Las células de la teca mantienen la forma plana observada en el estadio III. Se aprecia claramente el corión en la superficie interna de las células de la granulosa dando la apariencia de estar adherido a ésta. Se aprecian gotas de vitelo.

Grupo	mg inicial \bar{X}	mg final \bar{X}	% Δ
H ₂ O dest.	252.80	311.36	23.16
AMP c	210.90	261.00	23.75
GMP c	234.70	227.83	-2.92
LH-RH	223.95	339.31	51.06

Tabla 1. Promedio en peso de los organismos juveniles de X. hellerii al inicio y después de cinco semanas de tratamiento. (\bar{X} , promedio, Δ incremento).

Grupo	mm inicial \bar{X}	mm final \bar{X}	% Δ
H ₂ O dest.	21.06	22.95	8.23
AMP c	20.00	22.36	11.60
GMP c	21.14	20.70	-2.08
LH-RH	20.65	23.30	12.85

Tabla 2. Promedio en longitud al inicio y al final del tratamiento con AMPc, GMPc y LH-RH de peces juveniles de X. hellerii.

Grupo	Long. \bar{X} de gónadas (μ)
H ₂ O dest.	1650
AMP c	1240
GMP c	1580
LH-RH	1750

Tabla 3. Longitud promedio de las gónadas en peces juveniles de X. hellerii al final del tratamiento.

Número Muestra	No. Promedio de ovocitos observados (\bar{x})						$\Sigma \bar{x}$	G P O
	Atre.	I	II	III	IV	V		
1	0	31	27	1	0	0	59	H ₂ O reac.
2	1	12	9	10	1	0	33	
3	1	29	23	25	2	0	80	
4	1	22	22	26	12	2	85	
5	0	42	41	26	2	0	111	A M P c
6	0	9	9	16	8	3	45	
7	1	16	20	28	5	1	71	
8	1	11	10	7	1	2	42	
9	1	14	11	14	4	2	46	
10	1	12	12	16	5	2	48	
11	0	20	15	11	0	0	46	
12	2	12	20	25	7	0	66	G M P c
13	1	12	11	5	1	0	30	
14	2	41	35	28	4	0	110	
15	0	7	12	6	0	0	25	
16	1	20	20	21	5	1	68	
17	1	19	18	18	4	0	60	
18	1	37	22	18	2	0	80	
19	1	18	23	21	7	0	70	
20	1	54	26	14	2	0	97	
21	1	19	13	15	5	0	53	
22	1	27	13	11	1	0	53	
23	0	39	25	22	3	0	89	
24	0	8	7	4	1	0	20	L H - R H
25	1	22	14	14	5	2	58	
26	0	9	14	16	10	4	53	
27	0	2	7	10	2	1	22	
28	1	21	29	28	4	0	83	
29	1	14	10	12	3	1	41	
30	1	14	11	8	1	0	35	
31	1	22	18	26	9	1	77	
32	1	77	40	31	2	0	151	
33	0	17	18	19	5	0	59	
34	0	16	9	8	2	0	35	

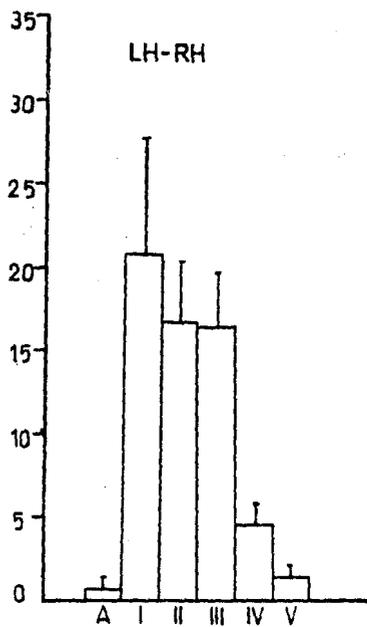
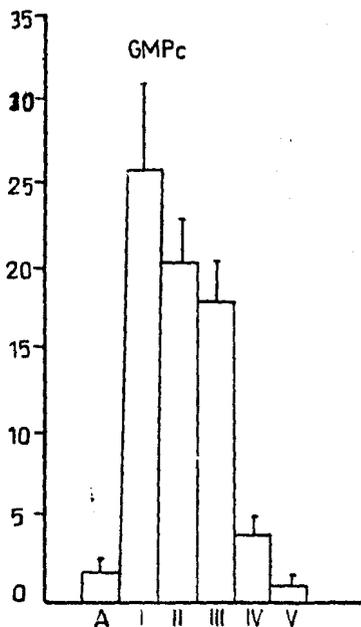
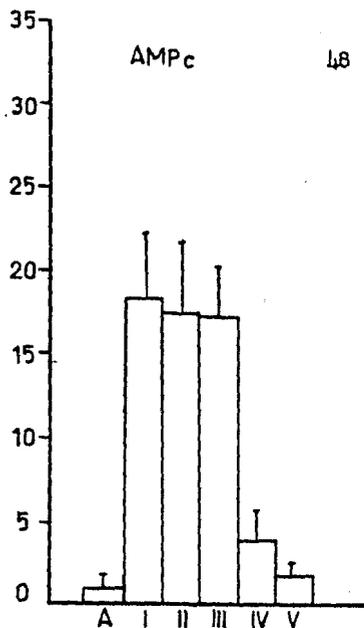
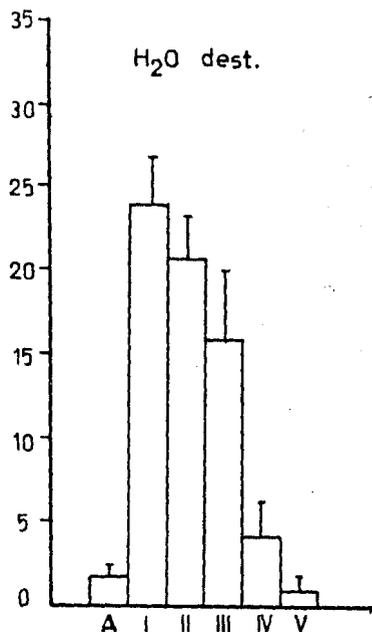
Tabla 4. Número promedio de ovocitos observados en diferentes estadios de maduración y número promedio de ovocitos observados en cada organismo de los grupos experimentales y grupos control.

X	Y= NO. promedio de ovocitos observados ($\bar{X} \pm s$)			
Estadio	H ₂ O dest.	AMP c	GMP c	LH-RH
Atrésico	1.0 \pm 0.50	0.57 \pm 0.53	1.0 \pm 0.60	0.54 \pm 0.52
I	23.5 \pm 15.69	17.71 \pm 11.30	25.4 \pm 14.30	20.18 \pm 19.85
II	20.2 \pm 7.80	16.85 \pm 11.20	19.8 \pm 7.04	16.09 \pm 10.16
III	15.5 \pm 12.12	16.85 \pm 7.62	17.0 \pm 7.12	16.00 \pm 8.90
IV	3.7 \pm 3.75	3.75 \pm 2.70	3.4 \pm 2.31	4.00 \pm 3.04
V	0.5 \pm 1.00	1.42 \pm 1.13	0.8 \pm 0.28	0.81 \pm 1.25

Tabla 5. Número promedio y desviación estándar de ovocitos observados en diferente estadio de maduración en peces juveniles de *X. hellerii*, tratados con nucleótidos cíclicos, LH-RH y agua destilada. (Gráfica 1 y 2).

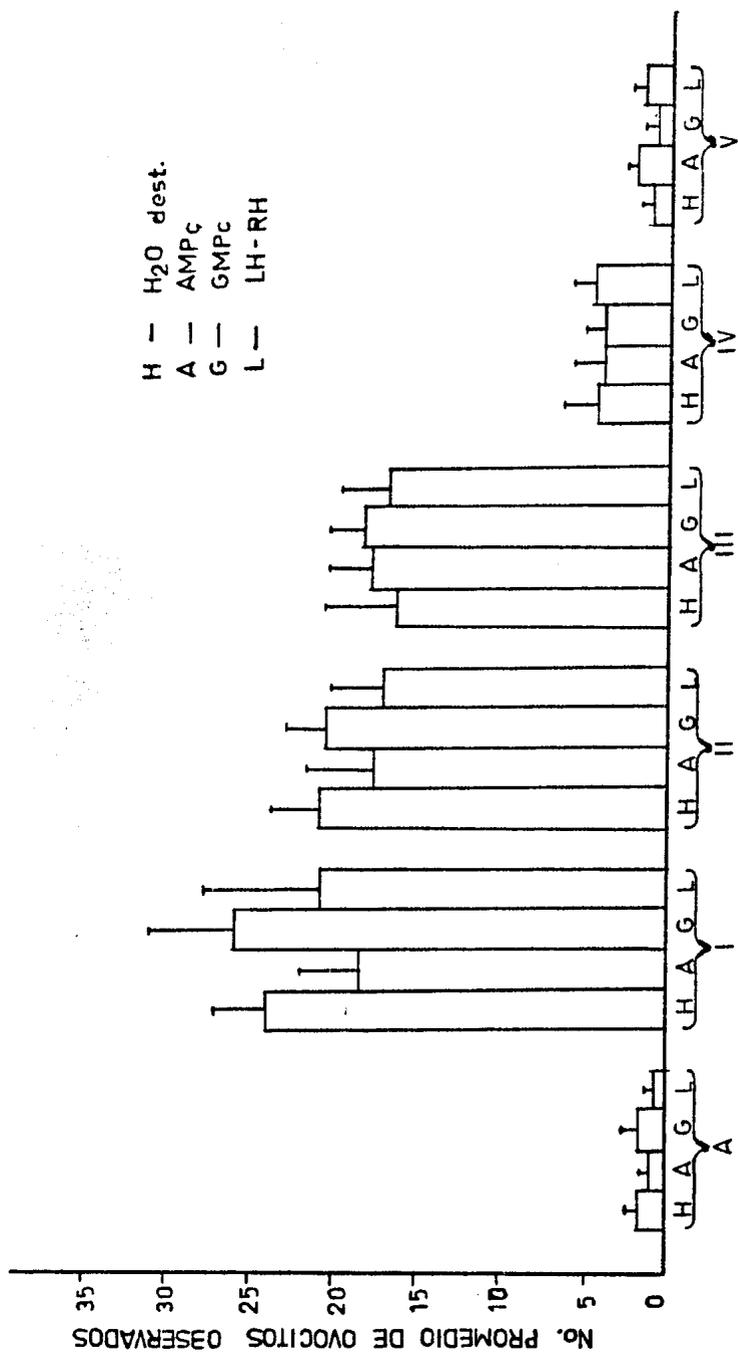
Grupo	vs	Grupo	Estadio	U
H ₂ O dest.	"	AMP c	atrésico	U = 95.0
H ₂ O dest.	"	AMP c	I	U = 75.5
H ₂ O dest.	"	AMP c	II	U = 86.0
H ₂ O dest.	"	AMP c	III	U = 95.5
H ₂ O dest.	"	AMP c	IV	U = 76.0
H ₂ O dest.	"	AMP c	V	U = 76.5
H ₂ O dest.	"	GMP c	atrésico	U = 66.0
H ₂ O dest.	"	GMP c	I	U = 87.5
H ₂ O dest.	"	GMP c	II	U = 101.5
H ₂ O dest.	"	GMP c	III	U = 98.5
H ₂ O dest.	"	GMP c	IV	U = 97.0
H ₂ O dest.	"	GMP c	V	U = 95.5
H ₂ O dest.	"	LH-RH	atrésico	U = 100.5
H ₂ O dest.	"	LH-RH	I	U = 59.5
H ₂ O dest.	"	LH-RH	II	U = 68.5
H ₂ O dest.	"	LH-RH	III	U = 99.5
H ₂ O dest.	"	LH-RH	IV	U = 86.0
H ₂ O dest.	"	LH-RH	V	U = 78.0

Tabla 6. Resultados obtenidos en la prueba de U de Mann-Whitney. Las diferencias de los grupos tratados con AMPc, GMPc y LH-RH con respecto al grupo tratado con H₂O destilada son significativas para $U \leq 112$ y $p = 0.05$.



ESTADIOS DE MADURACION OVOCITICA

Gráfica I. Promedio de ovocitos en diferentes estadios de maduración en peces juveniles de *X hellerii* tratados con AMPc y GMPc 4 µg/3er día/ 5 semanas LH-RH (0.2 µl / 3er día 5 semanas) y 0.2 µl H₂O dest. aplicados por vía intrahipofisial dos veces por semana durante cinco semanas.



ESTADIOS DE MADURACION OVOCITICA

Gráfica 2. Promedio de ovocitos observados en diferentes estadios de maduración, comparando los grupos tratados con AMPc, GMFc y LH-RH con el grupo tratado con agua destilada.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Durante las últimas décadas numerosas investigaciones se han enfocado a dilucidar el papel del AMP cíclico como un segundo mensajero intracelular que inicia una serie de respuestas fisiológicas diversas. El resultado del incremento en los niveles de AMP cíclico depende del tipo de células en el cual ocurre, diferentes células tienen un sistema diferente de respuesta.

El mecanismo del GMP es menos conocido aunque también ha sido postulado como un segundo mensajero intracelular actuando por un mecanismo similar al AMP cíclico.

En el presente trabajo se describe el efecto de la administración intrahipofisial de nucleótidos cíclicos en dosis de 4 µg/3er día/5 semanas, en los diferentes estadios de maduración ovárica en el teleósteo vivíparo Xiphophorus hellerii.

Los resultados sugieren que el incremento en los niveles de AMP cíclico en la hipófisis participan en la liberación de hormonas que estimulan en el ovario la diferenciación de la capa folicular, mientras que el GMP cíclico actuando de forma similar induce la diferenciación celular limitando su diferenciación en la mencionada capa (Lehninger, 1980), ya que se observa mayor cantidad de células que en el estadio III, pero no diferenciadas.

Tratando de apoyar aún más este concepto se analizaron las características histológicas de un grupo tratado con LH-RH sintético, que acelera la maduración ovárica en carpas, Cyprinus carpio (Sokolowska, 1978).

No se encontraron diferencias histológicas significativas entre los grupos tratados con AMP cíclico y LH-RH sintético en ninguno de los cuatro primeros estadios.

Al hacer la valoración cuantitativa el número de ovocitos por estadio de maduración en ambos grupos no se encontraron diferencias significativas en la actividad ovocítica, sin embargo el grupo tratado con LH-RH da claras muestras de una actividad moderadamente mayor a nivel histológico en el citoplasma y capa folicular.

El grupo tratado con GMP cíclico se mostró prácticamente inactivo a nivel histológico, no mostró indicios de síntesis de vitelo ni diferenciación folicular.

El efecto del AMP cíclico a nivel histológico es semejante al obtenido en el grupo tratado con LH-RH sintético. Se recomienda experimentar el empleo de AMP cíclico en diferentes dosis con el objeto de minetizar y posiblemente substituir el empleo de los factores liberadores en la inducción de maduración ovárica. La utilización de los nucleótidos combinados en diferentes dosis y vías de administración, podría ser motivo de estudio con resultados prometedores y de posible aplicación en piscicultura.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las valoraciones cuantitativas, el número promedio de ovocitos por estadio de maduración (determinados por su diámetro) no arroja diferencias significativas que puedan ser ampliamente discutidas (Gráfica 1 y 2), ya que la

maduración ovárica en todos los grupos parece ser semejante.

Se considera muy importante para futuros experimentos efectuar valoraciones cuantitativas y cualitativas apoyadas estrictamente en las características histológicas del ovocito. En el presente trabajo se determinaron ovocitos que por su diámetro corresponden al estadio V de maduración (Azevedo, 1974), sin embargo la valoración cualitativa de las características histológicas antes mencionadas demostró que los ovocitos cuantificados por su diámetro para el estadio V no corresponden a éste, sino a un estadio anterior.

La prueba estadística no paramétrica de U de Mann-Whitney indica que, existen diferencias significativas en el número de ovocitos promedio por estadio de maduración en los grupos tratados con AMP cíclico, GMP cíclico y LH-RH con respecto al grupo tratado con agua destilada.

Se registró un aumento en peso corporal en los grupos tratados con AMP cíclico, LH-RH y agua destilada registrándose el mayor incremento en el grupo tratado con LH-RH con un 51.06 %, el de AMP cíclico con un 23.75 % y el grupo tratado con agua destilada con 23.16 %. El grupo tratado con GMP cíclico perdió peso en un 2.92 %.

El incremento en talla fué similar, el grupo tratado con LH-RH aumento un 12.85 %; con AMP cíclico 11.60 % y con agua destilada 8.23 %, en el grupo tratado con GMP cíclico se registró un decremento de 2.08 %.

El decremento tanto en talla como en peso corporal del grupo tratado con GMP cíclico fué sorprendente. Hasta la fecha no se ha reportado en la bibliografía resultados similares, ni puede darse una explicación congruente al resultado obtenido.

Se registró la longitud de la gónada al final del tratamiento, alcanzando mayor longitud las del grupo tratado con LH-RH, GMP cíclico y AMP cíclico respectivamente, mostrando mayor actividad o-
vária las del grupo tratado con LH-RH y AMP cíclico.

No fué posible obtener el índice gonadoscématico debido a las dimensiones de la gónada y por registrar pesos inferiores a los miligramos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aries, S.S., 1972. Peces tropicales vivíparos. Fondo de Literatura Técnica, 2ª edición. Argentina, 70 p.
- Armed Forces Institute of Pathology, 1957. Manual of Histology and Special Staining Technics. Washington, D.C., 206 p.
- Austin, C.R. y R.V. Shorth, 1972. Hormonas en la reproducción. In: Procesos de reproducción en los mamíferos. (Ed.) La Prensa Médica Mexicana. México, 3:145 p.
- Azevedo, C., 1974. Evolution des enveloppes ovocytaires, au cours de l'ovogenèse, chez un téléostéen vivipare, Xiphophorus hellerii. Journal Microsc., Paris, 21(1): 43-54
- Bailey, Q.J., 1943. The ovarian cycle in the viviparous teleost Xiphophorus hellerii. Biol. Bull. 64: 206-223
- Bao, I.Y. y K.D. Kallman, 1962. Genetic control of the hypothalamo-pituitary axis and effect of hybridization on sexual maturation (Xiphophorus, Pisces, Poeciliidae). J. Exp. Zool. 220: 297-309
- Cheung, W.Y., 1970. Cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase; Demonstration of an activator. Biochem. Biophys. Res. Commun., 38(3): 533-538
- Fontaine, M., 1976. Hormones and the control of reproduction in aquaculture. J. Fish. Res. Board. Can. 33: 922-939

- Gordon, M.S., G.A. Bartholomeu, A.D. Grinnell, C.B. Jørgensen, F.N. White, 1979. Fisiología Animal: Principios y adaptaciones al medio ambiente. C.E.C.S.A.. México. 747 p.
- Jonas-Davis, J.A.C., V. Winfrey y G.E. Olson, 1983. Plasma membrane structure in spermatogenic cells of the swordtail (Teleostei, Xiphophorus hellerii). Gamete Res., 4; 309-324.
- Kallman, K.D., 1968. Evidence of the existence of transformer genes for sex in the teleost Xiphophorus maculatus. Genetics, 60: 811-828.
- Kallman, K.D., 1971. Inheritance of melanophore patterns and sex determination in the montezuma swordtail, Xiphophorus montezumae cortezi Rosen. Zoologica, (3): 77-94.
- Kallman, K.D. y J.W. Atz, 1966. Gene and chromosome homology in the fish of the genus Xiphophorus. Zoologica, 51(11): 107-142.
- Kallman, K.D. y R. Borowsky, 1972. The genetic gonopodial polymorphism in the two species of Poeciliid fish. Heredity, 28(3): 297-310.
- Kamrin, R.P. y L.R. Aronson, 1954. The effect of forebrain lesions on mating behavior in the male platyfish, Xiphophorus maculatus. Zoologica, 89(11): 133-140.
- Lan, T.J., 1982. Applications of endocrinology to fish culture. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 39: 111-137.
- Lambert, J.G., 1970. The ovary of the Guppy Poecilia reticulata the granulosa cells as sites of Steroid Biosynthesis. General and Comparative Endocrinology, 51: 464-476.
- Lehninger, A.L., 1980. Bioquímica, Las bases moleculares de la estructura y función celular. 2a. edición. Ed. Omega S.A.. Barcelona. 1117 p.

- Masaaki, M. y M. Okumo, 1982. Cyclic AMP induces maturation of trout sperm axoneme to initiate motility. Nature, 295(5): 703-704
- Mulner, O., D. Huchon, C. Thibier y R. Ozon, 1979. Cyclic AMP synthesis in Xenopus laevis oocytes inhibition by progesterone. Biochemica et Biophysica Acta. 582: 179-184
- Pastan, I., 1972. Cyclic AMP. Sci. Am., 227(2):
- Pickford, G.E. y J.W. Atz, 1957. The physiology of the pituitary gland of fishes. New York Zoological Society. New York, 613 p.
- Ratner, A., 1970. Stimulation of luteinizing hormone in vitro by dibutyl-cyclic-AMP and theophylline. Life Sci., 9: 1221-1226
- Ratner, A., W.C. Wilson, L. Srivastava y G.T. Peake, 1976. Dissociation between LH-release and pituitary cyclic nucleotide accumulation in response to synthetic LH-releasing hormone in vivo. Neuroendocrinology, 20: 23-42
- Robison, G.A., 1970. Cyclic AMP as a second messenger. J. Reprod. Fert., Suppl. 10: 55-74
- Schulz, R. y V. Blüm, 1982. Cyclic nucleotides in gonadal tissue during the reproductive cycle of Salmo gairdneri (Richardson). Acta Endocrin., Suppl. 242: 38-39
- Schulz, R., R. Schlaghecke y V. Blüm, 1981. Variations of gonadal cAMP content of male and female rainbow trout, Salmo gairdneri (Richardson) during the reproductive cycle. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 70 A: 53-56
- Siegel, S., 1978. Estadística no paramétrica. Ed. Trillas. México. 346 p.
- Sokolowska, M., W. Popek y Bieniarz, 1978. Synthetic releasing hormones LH/FSH-RH and LH-RH: Effect on intracerebral and intramuscular

- injection of female carp (Cyprinus carpio L.) maturation.
Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 18(4): 963-967
- Speaker, M.G. y F.R. Butcher, 1977. Cyclic nucleotide fluctuations during steroid induced meiotic maturation of frog oocytes. Nature, 267(30): 848-849
- Spruill, A. y A. Steiner, 1976. Immunohistochemical localization of cyclic nucleotides during testicular development. Journal of Cyclic Nucleotides Research, 2: 225-239
- Steiner, A.L., G.T. Peake, R.D. Utiger, I.E. Earl y D.M. Kipnis, 1970. Hypotalamic stimulation of growth hormone and thyrotropin release in vitro and pituitary 3',5'-adenosin cycle monophosphate. Endocrinology, 86: 1353-1360
- Sutherland, E., 1972. Studies on the mechanism of hormone action. Science, 177(4047): 401-408
- Ucci, A.A. Jr., 1972. Electron microscopic histochemical and autographic studies of spermatogenesis of the fish Xiphophorus hellerii. Dissertation. Abstr. Int., 33 B(6): 2146