



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA  
AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE INGENIERO AGROPECUARIO**

**EVALUACIÓN DE GnRH ANÁLOGA DE SALMÓN EN LA  
MADURACIÓN GONADAL DE PECES ADULTOS DE *Cichlasoma festae*  
EN LA HACIENDA EL PRADO**

**AUTOR: PARDO JIMENEZ, HENRY RODOLFO**

**TUFIÑO CHECA, KAROL ANDREA**

**DIRECTOR: ING. ORTIZ TIRADO, JUAN CRISTÓBAL, Ph.D.**

**SANGOLQUÍ**

**2020**



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

### **CERTIFICACIÓN**

Certifico que el trabajo de titulación, *“EVALUACIÓN DE GnRH ANÁLOGA DE SALMÓN EN LA MADURACIÓN GONADAL DE PECES ADULTOS DE Cichlasoma festae EN LA HACIENDA EL PRADO”* fue realizado por el señor *Pardo Jiménez Henry Rodolfo* y la señorita *Tufiño Checa Karol Andrea*, el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

**Sangolquí, 23 de enero de 2020.**

**Dr. Juan Cristóbal Ortiz Tirado, Ph. D.**

CC: 170999816-3



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD**

Nosotros, *Pardo Jiménez Henry Rodolfo y Tufiño Checa Karol Andrea* declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: *“Evaluación de GnRH análoga de salmón en la maduración gonadal de peces adultos de Cichlasoma festae en la Hacienda el Prado”* son de nuestra autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz

**Sangolquí, 23 de enero de 2020.**

**Henry Rodolfo Pardo Jiménez**

CC: 1723514178

**Karol Andrea Tufiño Checa**

CC: 1724810864



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**AUTORIZACIÓN**

*Nosotros, Pardo Jiménez Henry Rodolfo y Tufiño Checa Karol Andrea autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: “Evaluación de GnRH análoga de salmón en la maduración gonadal de peces adultos de Cichlasoma festae en la Hacienda el Prado” en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.*

**Sangolquí, 23 de enero de 2020**

**Henry Rodolfo Pardo Jiménez**

**CC:**

**Karol Andrea Tufiño Checa**

**CC: 1724810864**

## **DEDICATORIA**

*A mis queridos padres Víctor e Hilda por su apoyo incondicional, por sus consejos, comprensión y sobre todo por su amor, les doy gracias por sus enseñanzas motivo por el cual pude alcanzar mis objetivo.*

*A mis hermanos por todos los momentos vividos, por su cariño, su amor incondicional y su apoyo.*

*A mis amigos les doy gracias por el ánimo que me han brindado en mi formación académica,*

*Henry Pardo*

## DEDICATORIA

*A mis queridos padres Manolo y Tatiana por su apoyo incondicional, por sus consejos, comprensión y sobre todo por su amor, les doy gracias por sus enseñanzas motivo por el cual pude alcanzar mis objetivos, los amo con todo mi corazón.*

*A mis hermanos Andrés, Anita y Manolo por todos los momentos vividos, por su cariño, su amor incondicional y su apoyo, los quiero mucho.*

*A mis queridos abuelitos por su amor incondicional*

*A mis queridos tíos y tías les doy gracias por su cariño, por el ánimo que me han brindado y por su apoyo constante en mi formación académica, los amo mucho*

*Andrea Tufiño*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de las fuerzas Armadas ESPE y a la Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias IASA I por los conocimientos aportados en nuestra formación profesional, agradecemos a nuestros maestros por sus enseñanzas y tiempo invertido.

Al Dr. Juan Ortiz, director de tesis por su paciencia, aporte de conocimientos, consejos y guía, en el desarrollo de nuestro proyecto de titulación y sobre todo por su amistad, a la Ing. Daysi Muñoz por su predisposición y apoyo en la realización de nuestro proyecto.

Al apoyo y amor incondicional de nuestros padres y hermanos, por su respaldo en la realización y culminación de nuestro proyecto de titulación.

A nuestras familias por su amor, por su respaldo en nuestra formación personal y profesional

A nuestros amigos por las vivencias y momentos amenos compartidos.

Henry Pardo y Andrea Tufiño

## ÍNDICE DE CONTENIDO

### CARÁTULA

CERTIFICACIÓN .....	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD .....	ii
AUTORIZACIÓN.....	iii
DEDICATORIA .....	iv
DEDICATORIA .....	v
AGRADECIMIENTOS .....	vi
ÍNDICE DE CONTENIDO .....	vii
ÍNDICE DE TABLAS .....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
RESUMEN .....	xv
ABSTRACT .....	xvi

### CAPÍTULO I

#### INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes .....	1
1.2 Justificación .....	2
1.3 Objetivos .....	4
1.3.1 Objetivo General .....	4
1.3.2 Objetivos Específicos.....	4
1.4 Hipótesis.....	4

### CAPÍTULO II

#### REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Clasificación taxonómica de la Vieja Roja .....	5
2.1.1 Familia Cichlidae .....	6
2.2 Características en la reproducción de peces.....	7
2.2.1 Tipo y mecanismo de reproducción .....	7
2.2.1.1 Reproducción ginocórica .....	8
2.2.1.2 Fecundación externa .....	8

2.3	Endocrinología del proceso reproductivo .....	9
2.3.1	Regulación y control hormonal en la reproducción .....	10
2.3.2	Hormonas gonadotrofinas .....	10
2.3.2.1	Receptores específicos de gonadotropina y gónadas .....	11
2.4	Gametogénesis .....	12
2.4.1	Ovogénesis .....	12
2.4.2	Estructura gonadal.....	17
2.4.2.1	Anatomía de los ovarios.....	17
2.4.2.2	Estructura del ovocito en peces.....	18
2.4.3	Espermatogénesis.....	19
2.4.3.1	Anatomía de los testículos .....	22
2.5	Factores ambientales en la reproducción .....	24
2.6	Esteroides sexuales .....	25
2.6.1	Los andrógenos .....	26
2.6.2	Estrógenos .....	26
2.7	GnRH (a): caracterización .....	26
2.7.1	Aplicaciones de GnRH (a) .....	28
2.8	Técnicas de Inmunodetección ELISA.....	29
2.8.1	Antígenos .....	30
2.8.2	Respuesta inmunitaria.....	31
2.8.3	Tipos de ELISA .....	31
2.8.3.1	ELISA directo .....	31
2.8.3.2	ELISA indirecto .....	31
2.8.3.3	ELISA tipo «sándwich» .....	32
2.8.3.4	ELISA competitivo .....	32
2.8.4	Fundamento para la detección de Estradiol .....	32
2.9	Histología gonadal .....	33
2.9.1	Estadíos gonádicos hembras .....	34
2.9.1.1	Estadío I .....	34

2.9.1.2	Estadío II.....	34
2.9.1.3	Estadío III.....	35
2.9.1.4	Estadío IV .....	36
2.9.1.5	Estadío V.....	37
2.9.2	Estadíos gonádicos machos.....	38
2.9.2.1	Estadío I .....	38
2.9.2.2	Estadío II.....	39
2.9.2.3	Estadío III.....	39
2.9.2.4	Estadío IV .....	40
2.9.2.5	Estadío V.....	41
2.10	Sistema de Recirculación (RAS).....	41
2.10.1	Calidad de agua en sistema de recirculación (RAS).....	42
2.10.1.1	Temperatura .....	43
2.10.1.2	Oxígeno.....	43
2.10.1.3	pH.....	44
2.10.1.4	Compuestos de Nitrógeno.....	44
2.11	Titulación de grado .....	45

### **CAPÍTULO III**

#### **MATERIALES Y MÉTODOS**

3.1	Ubicación del Lugar de Investigación .....	46
3.1.1	Ubicación Política.....	46
3.1.2	Ubicación Geográfica del Experimento.....	46
3.1.3	Condiciones ambientales.....	47
3.2	Materiales.....	47
3.2.1	Materiales Biológicos .....	47
3.2.1.1	Proyecto multipropósito Baba.....	47
3.2.2	Materiales de Laboratorio .....	49
3.2.3	Equipos y programas.....	49
3.2.4	Reactivos.....	49

3.3	Métodos.....	49
3.3.1	Instalación del Sistema de Recirculación de Agua .....	50
3.3.2	Maduración del Filtro Biológico en el sistema RAS .....	51
3.3.3	Transporte y adaptación de peces .....	52
3.3.4	Inoculación de GnRH y extracción de sangre, gónadas, cerebro e hipófisis .....	54
3.3.5	Determinación de las concentraciones de Estradiol y 11-Ketotestosterona mediante Elisa.....	57
3.3.6	Análisis de calidad de Agua y curva de Nitrificación.....	62
3.3.7	Variables del estudio.....	62
3.3.7.1	Variables productivas.....	63
3.3.7.1.1	Parámetros formométricos .....	63
3.3.7.1.2	Concentraciones de estradiol para hembras y 11ketotestosterona para machos de <i>Cichlasoma festae</i> . .....	63
3.3.7.1.3	Histología de tejidos gonadales de <i>Cichlasoma festae</i> .....	64
3.3.7.2	Parámetros medioambientales.....	64
3.3.7.2.1	Adaptación de peces adultos <i>Cichlasoma festae</i> .....	64
3.3.7.2.2	Curva de nitrificación.....	65
3.3.8	Diseño Experimental.....	65
3.3.8.1	Factores .....	65
3.3.8.2	Tratamientos.....	65
3.3.8.3	Tipo de diseño.....	66
3.3.8.4	Características de las unidades experimentales .....	66
3.3.8.5	Croquis del diseño experimental.....	66
3.3.8.6	Modelo matemático.....	66
3.3.9	Análisis estadístico.....	67
3.3.10	Análisis funcional .....	67

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	Evaluación de los parámetros ambientales del sistema RAS.....	68
4.1.1	Evaluación de Bacterias presentes en el sistema .....	68
4.1.2	Evaluación de la Temperatura.....	70
4.1.3	Evaluación del Oxígeno .....	72
4.1.4	Evaluación del potencial de hidrógeno pH .....	73
4.1.5	Evaluación de la Curva de Nitrificación .....	74
4.1.6	Evaluación de parámetros morfométricos.....	76
4.2	Estimación de las concentraciones de 17 $\beta$ Estradiol y 11-Ketotestosterona .....	80
4.2.1	Parámetros productivos: índice gonadosomático, fecundidad absoluta y fecundidad relativa.....	90
4.3	Evaluación de Histología de tejidos gonadales de <i>Cichlasoma festae</i> .....	94
4.3.1	Evaluación de cambios estructurales en Hembras .....	94
4.3.2	Evaluación de cambios estructurales en Machos .....	100
4.4	Resumen.....	102

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1	Conclusiones .....	107
5.2	Recomendaciones.....	108
5.3	Bibliografía .....	109

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	<i>Especies Acuáticas existentes en el sistema hídrico del Proyecto Multipropósito</i>	
	<i>Baba</i> .....	48
<b>Tabla 2</b>	<i>Datos del pesaje y dosificación de los tratamientos en Cichlasoma festae</i> .....	56
<b>Tabla 3</b>	<i>Tratamientos aplicados a Cichlasoma festae</i> .....	66
<b>Tabla 4</b>	<i>Predominancia bacteriana en el sistema de recirculación</i> .....	69
<b>Tabla 5</b>	<i>Datos de parámetros morfométricos de Cichlasoma festae</i> .....	76
<b>Tabla 6</b>	<i>Promedio <math>\pm</math> desviación estándar de los parámetros morfométricos de Cichlasoma festae</i> .....	77
<b>Tabla 7</b>	<i>Masa corporal de los peces de Cichlasoma festae durante la maduración gonadal</i> ....	78
<b>Tabla 8</b>	<i>Verificación de supuestos para estradiol</i> .....	81
<b>Tabla 9</b>	<i>Análisis de varianza del comportamiento del estradiol circulante en hembras adultas</i>	81
<b>Tabla 10</b>	<i>Estadística descriptiva para el comportamiento del estradiol circulante en hembras adultas</i> .....	81
<b>Tabla 11</b>	<i>Estadística descriptiva de las concentraciones del estradiol circulante en hembras adultas Cichlasoma festae, bajo la acción de los tratamientos</i> .....	83
<b>Tabla 12</b>	<i>Verificación de supuestos para 11-Ketotestosterona</i> .....	85
<b>Tabla 13</b>	<i>Análisis de varianza del comportamiento de 11-ketotestosterona circulante en machos adultos</i> .....	86
<b>Tabla 14</b>	<i>Estadística descriptiva para el comportamiento del estradiol circulante en machos adultos</i> .....	86
<b>Tabla 15</b>	<i>Estadística descriptiva de las concentraciones de 11- ketotestosterona circulante en machos adultos Cichlasoma festae, bajo la acción de los tratamientos</i> .....	87
<b>Tabla 16</b>	<i>Índice gonadosomático de Cichlasoma festae durante su maduración gonadal en la hacienda El Prado</i> .....	90
<b>Tabla 17</b>	<i>Fecundidad absoluta y relativa de Cichlasoma festae</i> .....	92
<b>Tabla 18</b>	<i>Parámetros reproductivos de hembras Cichlasoma festae</i> .....	93
<b>Tabla 19</b>	<i>Resumen de parámetros productivos de hembras bajo el efecto de la GnRH</i> .....	103
<b>Tabla 20</b>	<i>Resumen de parámetros productivos de hembras bajo el efecto del suero fisiológico</i>	104
<b>Tabla 21</b>	<i>Resumen de parámetros productivos de machos bajo el efecto de la GnRH</i> .....	105
<b>Tabla 22</b>	<i>Resumen de parámetros productivos de machos bajo el efecto del suero fisiológico</i> .	106

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Vieja roja <i>Cichlasoma festae</i> macho .....	5
<b>Figura 2</b> Vieja roja <i>Cichlasoma festae</i> hembra .....	5
<b>Figura 3</b> Proceso de la vitelogénesis en peces. ....	14
<b>Figura 4</b> Diferenciación de un oocito vitelogénico y un oocito maduro, .....	15
<b>Figura 5</b> Esquema del crecimiento y maduración de ovocito .....	16
<b>Figura 6</b> Anatomía del aparato urogenital de peces hembras .....	17
<b>Figura 7</b> Estructuras del ovocito de peces hembra.....	19
<b>Figura 8</b> Proceso de la espermatogénesis.....	20
<b>Figura 9</b> Estructuras durante proceso de espermatogénesis en peces .....	22
<b>Figura 10</b> Anatomía del aparato urogenital de peces machos.....	23
<b>Figura 11</b> Anatomía del espermatozoide maduro de peces machos .....	24
<b>Figura 12</b> Esquema del eje reproductivo en peces .....	25
<b>Figura 13</b> Esquema de la técnica de ELISA.....	30
<b>Figura 14</b> Corte histológico de ovarios de <i>M. australis</i> en etapa de desarrollo Crecimiento primario. (100x) Tinción H&E.....	34
<b>Figura 15</b> Corte histológico de ovarios de <i>M. australis</i> en etapa de desarrollo Alveolo cortical. (100x) Tinción H&E .....	35
<b>Figura 16</b> Corte histológico de ovarios de <i>M. australis</i> en etapa de Vitelogénesis.....	36
<b>Figura 17</b> Corte histológico de ovarios de <i>M. australis</i> en etapa de desarrollo Maduración (maduros). (40x) Tinción H&E.....	37
<b>Figura 18</b> Corte histológico de ovarios de <i>M. australis</i> en etapa Desovados. (40x) Tinción H&E .....	38
<b>Figura 19</b> Corte histológico de testículos de <i>M. australis</i> en estado Inmaduros .....	38
<b>Figura 20</b> Corte histológico de testículo de <i>M. australis</i> en estado de desarrollo Espermatogénesis. (40x) Tinción H&E. (→) Espermátidas .....	39
<b>Figura 21</b> Corte histológico de testículos de <i>M. australis</i> en etapa de Vitelogénesis .....	40
<b>Figura 22</b> Corte histológico de testículos de <i>M. australis</i> en estado Espermiación. (40x) Tinción H&E .....	40
<b>Figura 23</b> Corte histológico de testículos de <i>M. australis</i> en estado Desovado. (40x) Tinción H&E .....	41
<b>Figura 24</b> Ubicación del aérea del Invernadero cuarentenario del IASA I.....	46
<b>Figura 25</b> Esquema del sistema de adaptación de peces tropicales en la hacienda El Prado IASA I .....	50
<b>Figura 26</b> GnRH de salmón para la inoculación a <i>Cichlasoma festae</i> .....	55
<b>Figura 27</b> Inoculación de GnRH (a) y suero fisiológico .....	55
<b>Figura 28</b> Preparación de estándares-Elisa .....	57

<b>Figura 29</b> Formato de la placa de muestras.....	58
<b>Figura 30</b> Preparación de estándares-Elisa .....	60
<b>Figura 31</b> Formato de la placa de muestras.....	61
<b>Figura 32</b> Croquis experimental.....	66
<b>Figura 33</b> Bacterias presentes en el sistema de recirculación (RAS).	
a)Enterobacter sp, b) Proteus sp, c) Bacillus sp.....	69
<b>Figura 34</b> Temperatura ambiental del Invernadero del IASA I .....	70
<b>Figura 35</b> Temperatura del agua tanque E1, E2 RAS .....	71
<b>Figura 36</b> Oxígeno disponible del tanque E1 y E2 (RAS) .....	73
<b>Figura 37</b> pH del tanque E1 y E2 (RAS).....	74
<b>Figura 38</b> Comportamiento ambiental del NH <sub>3</sub> +NH <sub>4</sub> y su transformación en el tiempo .....	75
<b>Figura 39</b> Promedio ± desviación estándar de la conversión alimenticia de <i>Cichlasoma festae</i> ..	79
<b>Figura 40</b> Promedio ± desviación estándar de las concentraciones de estradiol (pg/ml) bajo el efecto de la GnRH .....	83
<b>Figura 41</b> Promedio ± desviación estándar de las concentraciones de estradiol (pg/ml) bajo el efecto del suero fisiológico .....	84
<b>Figura 42</b> Promedio ± desviación estándar de las concentraciones de 11-Ketotestosterona (pg/ml) bajo el efecto de GnRH .....	88
<b>Figura 43</b> Promedio ± desviación estándar de las concentraciones de 11-Ketotestosterona (pg/ml) bajo el efecto del suero fisiológico.....	88
<b>Figura 44</b> Promedio ± desviación estándar del diámetro del eje mayor .....	94
<b>Figura 45</b> Corte transversal de ovario en estadio II de <i>Cichlasoma festae</i> Hembra de GnRH3 ..	95
<b>Figura 46</b> Corte transversal de ovario en estadio II de <i>Cichlasoma festae</i> Hembra de S.F.H1. ...	95
<b>Figura 47</b> Corte transversal de ovario en estadio II de <i>Cichlasoma festae</i> Hembra de S.F.H3 ..	96
<b>Figura 48</b> Corte transversal de ovario en estadio III de <i>Cichlasoma festae</i> Hembra de GnRH1 ..	97
<b>Figura 49</b> Corte transversal de ovario en estadio III de <i>Cichlasoma festae</i> Hembra de GnRH2 ..	98
<b>Figura 50</b> Corte transversal de ovario en estadio IV de <i>Cichlasoma festae</i> Hembra de S.F.H2... ..	99
<b>Figura 51</b> Corte transversal de testículo en Estadío II de <i>Cichlasoma festae</i> Macho de GnRH2.....	100
<b>Figura 52</b> Corte transversal de testículo en Estadío II de <i>Cichlasoma festae</i> Macho de GnRH3.....	100
<b>Figura 53</b> Corte transversal de testículo en Estadío III de <i>Cichlasoma festae</i> Macho de S.F.M2 .....	101
<b>Figura 54</b> Corte transversal de testículo en Estadío III de <i>Cichlasoma festae</i> Macho de S.F.M3 .....	102

## RESUMEN

La principal causa de pérdida de Vieja roja (*Cichlasoma festae*), está dado por cambios ambientales de su hábitat nativo. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la hormona liberadora de las gonadotrofinas análoga de salmón (GnRHs) en la maduración gonadal y concentraciones esteroidales de peces adultos de *Cichlasoma festae*. Para este propósito se implementó un sistema de recirculación de agua (RAS) para domesticación de especies tropicales en la hacienda El Prado IASA I. Se determinó las concentraciones de estradiol y 11-ketotestosterona de (*Cichlasoma festae*) bajo la acción de GnRH análoga de salmón, y se valoró los cambios estructurales en tejidos gonadales mediante histología clásica. Se determinó la fecundidad absoluta de hembras inoculadas GnRH de  $2676 \pm 1325,24$  ovocitos y fecundidad relativa de  $13,94 \pm 7,10$  g/peso, la fecundidad absoluta de hembras inoculadas con suero fisiológico de  $1568 \pm 582,98$  ovocitos y fecundidad relativa de  $8,06 \pm 2,05$  peso. En el seguimiento de esteroides sexuales, las concentraciones de Estradiol van desde 63,21 a 1023 pg/mL, en donde el efecto de la GnRH afecta la síntesis y secreción de estradiol con valores desde 96,96 hasta los 118,29 pg/mL. Las concentraciones de 11-ketotestosterona varían por individuo de 68 a 130,38 pg/mL y no detectan diferencias por efecto de GnRH ( $p < 0,05$ ).

### **PALABRAS CLAVE:**

- **VIEJA ROJA (*Cichlasoma festae*)**
- **GnRH**
- **CONTROL DE LA REPRODUCCIÓN DE ESPECIES NATIVAS**

## ABSTRACT

The main cause of loss of Vieja roja *Cichlasoma festae*, is due to environmental changes of its native habitat. The objective of the present study was to evaluate the effect of the releasing hormone of salmon analog gonadotrophins (GnRHs) on gonadal maturation and steroidal concentrations of adult *Cichlasoma festae* fish. For this purpose, a water recirculation system (RAS) for domestication of tropical species was implemented in the hacienda El Prado IASA 1. The concentrations of estradiol and 11 keto-testosterone of (*Cichlasoma festae*) were determined under the action of analogous GnRH salmon, and structural changes in gonadal tissues were assessed by classical histology. The absolute fecundity of GnRH inoculated females of  $2676 \pm 1325.24$  oocytes and relative fecundity of  $13.94 \pm 7.10$  g / weight, the absolute fecundity of females inoculated with physiological serum of  $1568 \pm 582.98$  oocytes and relative fecundity were determined  $8.06 \pm 2.05$  weight. In the monitoring of sex steroids, Estradiol concentrations range from 63.21 to 1023 pg / mL, where the effect of GnRH affects the synthesis and secretion of estradiol with values from 96.96 to 118.29 pg / mL. The concentrations of 11-ketotestosterone vary by individual from 68 to 130.38 pg / mL and do not detect differences due to the effect of GnRH ( $p < 0.05$ ).

## KEYWORDS:

- **VIEJA ROJA (*Cichlasoma festae*)**
- **GnRH**
- **CONTROL OF THE REPRODUCTION OF NATIVE SPECIES**

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

Los peces en su hábitat natural se encuentran sometidos a constantes estímulos ambientales los cuales activan una serie de eventos fisiológicos como son la proliferación oogonial, vitelogénesis, maduración de los oocitos y ovulación, que provocan la formación y desarrollo de los gametos dando inicio a los procesos reproductivos. Los peces en cautiverio no se reproducen de manera espontánea, en estas condiciones, las gónadas de los mismos crecen y se desarrollan normalmente, pero la maduración final del ovocito, ovulación y espermiación no ocurren. Muchos de los eventos mencionados, en el medio natural son iniciados por un aumento en la secreción de la gonadotropina hipofisaria (GtH), mientras que en peces mantenidos en cautividad son bloqueados los procesos esteroidales y relacionados a la reproducción (González, 2017).

En los cíclidos, la reproducción implica una serie de eventos en los que las gonadotrofinas hipofisarias tienen el eje principal, se sintetizan en la hipófisis, concretamente en la adenohipófisis y representan el principal factor liberador de las gonadotrofinas, estas hormonas son la Folículo estimulante (FSH) y Luteinizante (LH), las cuales se encargan de regular los procesos de gametogénesis y esteroidogénesis gonadal en vertebrados (Carrillo, 2009).

La GnRH y dopamina (DA) son las principales neurohormonas estimuladora e inhibidora que controlan la liberación de las GtH en peces. El aumento de la GtH que precede la maduración del oocito y la ovulación, es el resultado de una estimulación por la GnRH en combinación con una disminución de la inhibición de la dopamina. La doble regulación neurohormonal de la secreción de GtH a través de la GnRH y la DA actúa como un factor liberador-inhibidor, el cual

proporciona una base para la técnica altamente efectiva para inducir la ovulación de muchos peces en cultivo (Carrillo, 2009).

Se ha encontrado que la familia *Cichlidae* es la más representativa de la comunidad de peces, son originarios de América, su distribución va desde el suroeste de Texas y México, Centroamérica y Sudamérica, se presenta en una gran variedad de hábitats principalmente ríos de agua dulce subtropical y tropical. En Ecuador la presencia de cuencas hidrográficas con montañas costeras, cordilleras andinas y la tercera cordillera, han influido en la morfología de los sistemas hidrográficos y en sus características ecológicas, en su mayoría son peces de agua dulce intermareales. Una de las familias presentes en Ecuador es la *Cichlidae*, que incluye vieja roja *Cichlasoma festae* nativa y distribuida en la cuenca alta del río Guayas, provincia de Los Ríos y Santo Domingo de los Tsáchilas. Este estudio indica la disminución de existencia de esta especie y la situación crítica de vieja roja *Cichlasoma festae* y la necesidad de elaborar un plan de conservación de dicha especie (Barriga, 2011).

## **1.2 Justificación**

La familia *Cichlidae* es una de las más importantes en la acuicultura, que cuenta con aproximadamente 1000 especies, son de importancia ornamental y otras en la producción de carne para el consumo humano. Por lo tanto, al considerar al Ecuador como la capital pesquera del Pacífico tropical sur-oriental con más de 900 especies nativas, la Vieja roja *Cichlasoma festae* representa una especie de agua dulce de gran uso local (Ortega, 2015).

Vieja roja *Cichlasoma festae* se encuentra distribuida principalmente en la ribera alta de la cuenca del río Guayas. En la actualidad existe disminución su población en su hábitat natural, por causas como la minera, agricultura, ganadería, pesca indiscriminada, también por los

frecuentes desbordamientos de ríos en temporada invernal e invasión de su hábitat por otras especies introducidas en cuencas naturales como es la tilapia; por lo tanto, esta especie nativa, se encuentra escasa y sin alcanzar su completo desarrollo, afectando su ciclo reproductivo. De acuerdo al Instituto Nacional de Pesca del Ecuador, la captura de especies nativas es cada vez menor por lo que se encuentran en situación de riesgo y se debería tomar acciones inmediatamente con todas las especies nativas del país (Castro, 2011).

Es importante realizar un proceso de adaptación y domesticación de vieja roja *Cichlasoma festae* en cautiverio, bajo condiciones controladas, con la finalidad de conocer la etología de la especie. Esto nos permitirá conocer a la especie, dimorfismo sexual, su régimen alimenticio y brindar las mejores condiciones, en un sistema de recirculación de agua, con todas las condiciones necesarias para simular el hábitat natural y disminuir el estrés y otros problemas que puedan presentarse en su manejo. La importancia de la adaptación es ampliar la información sobre la etapa reproductiva, lograr la reproducción de la especie, producir semilla viable (alevines) para repoblación de su hábitat natural y producción en cautiverio. El proyecto beneficiará a los pescadores de las zonas donde se distribuye la especie y a los productores piscícolas, que ven a la vieja roja como una buena alternativa para producción debido al rendimiento a la canal y su agradable sabor.

El presente estudio evaluó el efecto de la GnRH análoga de salmón en la maduración gonadal de peces adultos de *Cichlasoma festae*, con el fin de obtener un perfil hormonal de acuerdo a cada uno de los tratamientos establecidos.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo General**

Evaluar el efecto de GnRH análoga de salmón en la maduración gonadal y concentraciones esteroidales de peces adultos de *Cichlasoma festae* en la hacienda El Prado IASA I.

#### **1.3.2 Objetivos Específicos**

- Implementar un sistema de recirculación de agua (RAS) para la domesticación de especies tropicales en el invernadero cuarentenario del IASA 1.
- Determinar las concentraciones de estradiol y 11-ketotestosterona de vieja roja (*Cichlasoma festae*) bajo la acción de diferentes dosificaciones de GnRH análoga de salmón en la hacienda El Prado IASA I.
- Valorar cambios estructurales en tejidos gonadales de vieja roja (*Cichlasoma festae*) mediante histología clásica.

### **1.4 Hipótesis**

H<sub>0</sub>: El uso de la GnRH (s) análoga en peces adultos *Cichlasoma festae* en un sistema de recirculación de agua, no genera cambios en las concentraciones esteroidales durante los períodos de maduración gonadal.

H<sub>1</sub>: El uso de la GnRH (s) análoga en peces adultos de *Cichlasoma festae* en un sistema de recirculación de agua, genera cambios en las concentraciones esteroidales durante los períodos de maduración gonadal.

## CAPÍTULO II

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 2.1 Clasificación taxonómica de la Vieja Roja

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Clase	Actinopterygii
Subclase	Neopterygii
Orden	Perciformes
Familia	Cichlidae
Género	<i>Cichlasoma</i>
Especie	<i>Cichlasoma festae</i>



*Figura 1.* Vieja roja *Cichlasoma festae* macho



*Figura 2.* Vieja roja *Cichlasoma festae* hembra

### 2.1.1 Familia Cichlidae

Los peces de la familia *Cichlidae*, se encuentran distribuidas por todo el mundo, tienen la capacidad de adaptarse a un amplio rango de condiciones ambientales como temperatura y salinidad principalmente. El manejo reproductivo de especies como la tilapia es fácil de realizar y obtener resultados positivos en su reproducción. El género *Oreochromis sp* es uno de los grupos más grandes de la familia *Cichlidae* que genera interés en el incremento de su productividad, especialmente en países como Brasil, Colombia, Costa Rica y Ecuador, con un enfoque al incremento de la producción con fines de exportación (Carrillo, 2009).

Vieja roja *Cichlasoma festae* puede superar los 2000 gramos de peso y tiene una longitud de 30 cm o superior cuando alcanzan su máximo desarrollo; tiene una similitud en el aspecto de una tilapia roja (*Oreochromis sp*) por lo que puede confundirse a simple vista. La vieja roja o colorada tiene una boca protráctil, labios carnosos, dientes cónicos, branquio-espinas cortas, estómago expandible; presenta una coloración roja intensa desde el inicio de la boca hasta el opérculo, su cuerpo es de color rojo-amarillo, atravesado en forma perpendicular al dorso por franjas negras. La hembra de vieja roja tiene un color rojizo y verde, más intenso y vivo que los machos, los cuales presentan un color más oscuro que las hembras, un color verde militar en su mayoría, ambos presentan franjas verticales, el macho es de mayor tamaño que la hembra, ambos tienen la capacidad de mimetizarse en cierto modo en el ambiente donde se encuentran. Los juveniles tienen mucha similitud a los juveniles de tilapia (*Oreochromis sp*), destacándose el color gris oscuro en las terminaciones de las aletas pectorales y las diez franjas negras (González, 2017).

## 2.2 Características en la reproducción de peces

El grupo de los teleósteos están representados por más de 26 mil especies descritas, estas presentan gran diversidad biológica, morfológica y ecológica. Las estrategias reproductivas de los teleósteos es el conjunto de características que una especie acuática ha desarrollado para tener éxito en la reproducción. Las especies acuáticas tienen diferentes mecanismos reproductivos y las combinaciones con el hábitat, la fisiología y su comportamiento son factores muy importantes para determinar una estrategia para lograr su reproducción. Esta estrategia puede requerir un gran número de huevos o poca cantidad de estos, pero con gran oportunidad para la sobrevivencia. Así mismo los padres tienen que asegurar la sobrevivencia de una porción de huevos por medio de la defensa de los mismos o encubriéndolos y protegiendo a las crías. El lugar y tiempo son generalmente de gran importancia en el desove de muchas especies, ya que, con buenas condiciones ambientales, tales como la temperatura luz, etc. Los gametos desarrollan y maduran. La luz y la temperatura juegan un papel relevante en el control del ritmo de la reproducción de las especies que desovan estacionalmente (Barriga, 2011).

### 2.2.1 Tipo y mecanismo de reproducción

Existen varios métodos para la reproducción de peces cultivados. La elección de uno u otro método depende de la biología reproductiva de la especie, las condiciones ambientales locales y las instalaciones disponibles. Estos métodos se pueden agrupar en tres categorías: reproducción *natural*; reproducción *semi-artificial* y reproducción *artificial* (FAO, 2018).

En la *reproducción natural* se colocan juntos machos y hembras en un estanque o un área para su reproducción, este método se utiliza para abaratar costos en una producción piscícola. En la *reproducción semi-artificial*, se les administra a los peces una *inyección de productos químicos*,

por ejemplo, extracto de las glándulas pituitarias o análogas de GnRH, que provocan el desove, se controla los estanques destinados para la reproducción dándoles las mejores condiciones para tener una mejor calidad de los huevos fertilizados. En la *reproducción artificial*, se les administra a las hembras una o *más inyecciones de productos químicos* que regulan la maduración final de los *oocitos* en los ovarios. Los óvulos maduros se extraen de las hembras tan pronto como maduran, los machos también se inyectan productos químicos, pero se tiene por separado machos y hembras. Los huevos se *fertilizan artificialmente* utilizando esperma obtenido de los machos y se incuban en *condiciones controladas* (FAO, 2018).

#### **2.2.1.1 Reproducción ginocórica**

Este tipo de reproducción se lleva a cabo en especies cuyos individuos adultos se reproducen solo como machos o solo como hembras, es decir poseen un solo sistema reproductor, pudiendo tener ovarios o testículos, este tipo de reproducción se da en la mayoría de especies de cultivo y en ambiente natural (Rodríguez, Moya, & Duarte, 2015)

#### **2.2.1.2 Fecundación externa**

Las especies de vieja roja son de fecundación externa en su medio natural, esta consiste en que la hembra expulsa los huevos al medio, el macho expulsa los espermatozoides al medio y se da fertilización externa. La forma de desove de los peces puede ser pelágica o desovadores pelágicos es decir que los huevos son liberados en la columna de agua y desovadores demersales, son las especies que producen huevos con mayor densidad que el agua, tienen la capacidad de adherirse al fondo, estos desovadores producen huevos más grandes con mayor volumen, un ejemplo de estas especies de cultivo son la trucha y tilapia (González, 2017).

### **2.3 Endocrinología del proceso reproductivo**

Uno de los objetivos principales del cultivo de peces es la reproducción de las especies de mayor interés socio-económico, la supervivencia de la especie y mejorar la calidad de la especie con un manejo correcto por parte del ser humano. En este proceso se da el mantenimiento de los peces en cautiverio, cuyo objeto es la comercialización para consumo debido al contenido proteico y en nutrientes que aporta el consumo de peces a la dieta diaria, además de incrementar su producción por enzimas de los niveles producidos en su medio natural (Carrillo, 2009).

El cultivo de peces en cautiverio o en sistema tecnificados de producción va a variar las condiciones reproductivas de estos en comparación a las condiciones que se presentan en su medio natural sin la acción antropogénica, provocando alteraciones en sus procesos fisiológicos, uno de ellos es su ciclo reproductivo. El período de domesticación de una especie lleva un tiempo determinado, debido a que debe adaptarse a un sistema de crianza, dieta balanceada y el manejo zootecnista. El interés socio-económico es indispensable para el desarrollo de un sistema de acuicultura en cautiverio (Jiménez, 2009).

El mecanismo que regula la función reproductora en peces es el eje cerebro-hipófisis-gónadas. El conocimiento de este sistema es esencial para la adaptación de una especie en cautiverio y permite controlar las etapas de la reproducción. Por lo tanto, la reproducción de los peces es un proceso complejo debido al conjunto de elementos que determinan que un organismo se reproduzca. Los eventos reproductivos están sujetos a múltiples estímulos del medio ambiente y de los propios organismos. La integración de los diversos estímulos se lleva a cabo por el sistema endocrino de los organismos que regula todos los procesos fisiológicos, incluyendo la reproducción (Carrillo, 2009).

El sistema endocrino se compone de un conjunto de órganos y tejidos que liberan mensajeros químicos denominados hormonas. Las hormonas se encargan de la transmisión de información entre los diferentes órganos y tejidos que integran el sistema endocrino (Martos, Cádiz, Martínez, & Mancera, 2015)

### **2.3.1 Regulación y control hormonal en la reproducción**

La información del foto-período es traducida por el órgano pineal en una señal neuroendocrina que corresponde con la hormona melatonina. Esta hormona que también es secretada por la retina en menor proporción, parece mediar la mayoría de las actividades rítmicas y estacionales de los vertebrados, se ha descrito numerosos ritmos de producción de melatonina en especies de agua dulce y agua marina. En estas especies los niveles de melatonina plasmática se elevan durante la noche y descienden durante el día. Estos cambios se deben a la expresión y actividad rítmica de la enzima serotonina N-acetiltransferasa pineal (NAT), la temperatura del agua es otro factor que influye en esta actividad. El estímulo que producen es la descarga de GnRH en la hipófisis para la secreción de la hormona LH y FSH liberándolas a la circulación plasmática y actuando sobre todo a nivel gonadal, donde se une específicamente a los receptores de membrana de las células foliculares (teca y granuloso) en hembras y células de Leydig y Sertoli en machos (Carrillo, 2009).

### **2.3.2 Hormonas gonadotrofinas**

Las gonadotrofinas GTH I y GTH II en peces tienen una estructura muy similar basada en dos dominios proteicos, donde uno es constante en ambas ( $\alpha$ ) y el otro específico para cada hormona ( $\text{FSH}\beta$  y  $\text{LH}\beta$ ), sin embargo, solo la forma cuaternaria de estas proteínas es funcional ( $\alpha+\beta$ ). Estas hormonas son sintetizadas en la adenohipófisis y se sintetizan a diferencia de los

mamíferos, en compartimentos o células secretoras separadas. No obstante, al igual que ocurre con el resto de organismos superiores, la FSH parece estar constante a lo largo de todo el ciclo reproductivo, se asocia al crecimiento de las estructuras germinales junto con la incorporación de la vitelogenina producida en el hígado, incrementándose en la oogénesis y espermatogénesis y posteriormente a estas fases, a diferencia que la LH, la cual experimenta un pico muy significativo en el momento de la maduración final, ovulación o espermiogénesis y espermiación en machos. La inducción de las gonadotrofinas no solo está influenciada por la acción de la GnRH, de hecho, existen otros factores que son capaces de influir y regular en cierta medida las producciones de estas hormonas (Ureña, González, Triana, & Linares, 2014).

### **2.3.2.1 Receptores específicos de gonadotropina y gónadas**

Los receptores específicos de las gonadotrofinas en peces son GTHR<sub>s</sub> I y GTHR<sub>s</sub> II. GTHR<sub>s</sub> I presenta una cierta especificidad para LH, a diferencia que GTHR<sub>s</sub> II, que solo presenta exclusivamente afinidad para esta hormona, algo que se vuelve más acentuado cuando se tratan con hormonas homólogas. Las gonadotrofinas presentan receptores específicos principalmente en gónadas, aunque se han llegado a detectar en el riñón. No obstante, en la gónada, la presencia de estos receptores en sus diferentes tejidos orgánicos no siempre es constante (Carrillo, 2009).

Se ha comprobado que la FSH puede dar lugar a una espermatogénesis completa, aunque anormal en algunas especies sin la acción de LH. Es decir, la testosterona necesaria para finalizar este proceso liberada por estas poblaciones celulares testiculares, puede ser también estimulada por la acción de la FSH aunque no con la misma eficacia (Jiménez, 2009)

## **2.4 Gametogénesis**

La gametogénesis es el proceso de formación de los gametos femenino y masculino, es decir células reproductoras sexuales, ovocitos y espermatozoides respectivamente a través de los procesos de ovogénesis y espermatogénesis, por medio de la meiosis a partir de las células germinales, mediante este proceso la carga cromosómica de las células germinales que son diploides ( $2n$ ) se reduce a haploide ( $n$ ), es decir a la mitad de su carga y se completará con la fecundación de los gametos femenino ( $n$ ) y masculino ( $n$ ) para volver a su carga cromosómica completa ( $2n$ ). El Espermatozoide es en principio una célula redonda y voluminosa, que reducirá su tamaño hasta adquirir una forma alargada y El óvulo: célula redonda con abundante vitelogenina irá aumentando su tamaño. Durante la gametogénesis se dan una serie de cambios que tienen dos finalidades principales, reducir el tamaño de los cromosomas en un proceso llamado meiosis y modificar la forma de los gametos (Carrillo, 2009).

### **2.4.1 Ovogénesis**

Es la transformación meiótica de la ovogonia en ovocito primario. Se divide en diferentes fases teniendo en cuenta: el tamaño de los ovocitos, distribución y presencia de inclusiones celulares y morfología de los cromosomas. La ovogénesis se origina a partir del epitelio del lumen ovárico. El primer estadio en el desarrollo de los gametos femeninos es la proliferación celular. En esta fase las ovogonias entran en mitosis sufriendo varias divisiones celulares y comienza la meiosis, deteniéndose en el diploteno de la primera profase. En ese momento, cuando los oocitos, entran en una fase de crecimiento, que varía según las especies, pero que en general se debe a la acumulación de proteínas complejas que formarán el vitelo, la proteína es la vitelogenina, esencial para la formación del ovocito (Fernández, 2011).

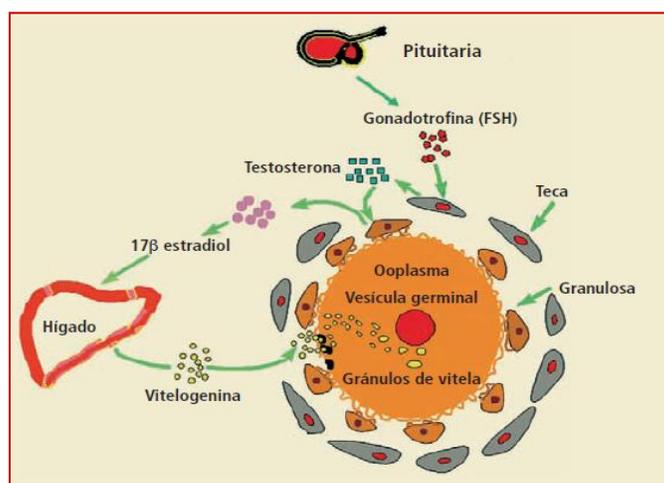
**Crecimiento primario:** Es la conversión de la oogonia en ovocito I, no depende de GTH cada ovocito se rodea de células foliculares denominadas células de la teca y granulosa: secretoras de membrana basal. El ovocito posee un núcleo grande central con 1 nucléolo, delgada capa del citoplasma (Fernández, 2011).

**Estado perinuclear:** El oocito crece 1000 veces en relación a su tamaño en el crecimiento primario, el núcleo crece y se ubica en una posición excéntrica e incrementa en número de nucléolos. El citoplasma se tiñe intensamente, pero en el estado más avanzado pueden observarse vacuolas que marcan el inicio de alveolos corticales. El oocito se rodea de células tecales y células superficiales de aspecto escamoso y forman los cromosomas plumosos que indican procesos de transcripción. Además se evidencia la presencia del “Cuerpo de Balbiani” o núcleo de vitelo amorfo en el citoplasma perinuclear. La fabricación de organelos citoplasmáticos, está formado por ribo-núcleo proteínas asociadas a mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplasmático y cuerpos multivesiculares. La superficie del oocito se extiende y contacta con células alrededor de estos, de estas células se forman precursores de la membrana vitelina, los oocitos en este estado de desarrollo están presentes en los ovarios y son propios de hembras juveniles. Así pueden permanecer durante años (Kiewek, 2009).

**Alvéolos corticales o previtelogénesis:** Es una fase dependiente de las gonadotropinas circulantes, en la que aparecen vesículas del vitelo en el citoplasma y se ubican inicialmente alrededor del núcleo, luego migran a la periferia del citoplasma. Los alveolos incorporan histidina, mucopolisacáridos y glucosa sintetizados dentro del oocito, con abundantes residuos de ácido siálico y vacían su contenido dentro de la membrana del huevo en el espacio perivitelino

durante la fecundación. En esta etapa comienza a formarse la zona pelúcida. Es importante recalcar que la meiosis está detenida (Yzasiga & Zelada, 2017)

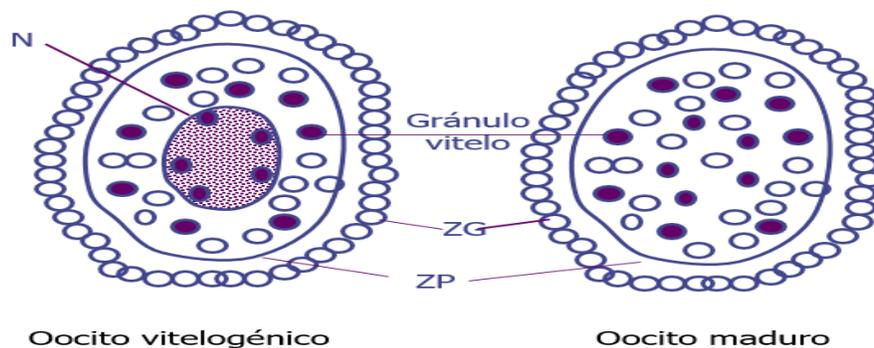
**Vitelogénesis:** Es el evento encargado del crecimiento de los ovocitos en los peces. Su función principal es el secuestro y empaquetamiento de la vitelogenina. El estradiol producido dentro del ovario bajo la influencia de las gonadotropinas es introducido hacia el tejido vascular y estimula la síntesis y la secreción de la vitelogenina en el hígado y que viaja a través del torrente sanguíneo a su lugar de acción. La vitelogenina (VTG), es una glicolipofosfoproteína de plasma específica de las hembras en estado de maduración gonadal y coincide con la aparición de gránulos de vitelo por debajo de la membrana vitelina. Los niveles máximos de VTG se observan dos meses antes del desove en peces sincrónicos y se mantienen elevados durante toda la época de desove y también post-desove. En la finalización de la vitelogénesis hay una aparición de la hormona GtH II, que induce una disminución a nivel plasmático del estradiol y aumentando del nivel del esteroide inductor de la maduración (MIS) que induce la maduración final del ovocito (Kiewek, 2009).



**Figura 3.** Proceso de la vitelogénesis en peces.

**Fuente:** (Yzasiga & Zelada, 2017).

Maduración: Reinicia la meiosis, migración del núcleo con fusión de membranas y se forma el primer corpúsculo polar, para luego realizar la ovulación. Las células de la granulosa pierden actividad aromataasa y decrecen las concentraciones de  $17 \beta$ -estradiol posterior a ello se corta el proceso de feedback negativo produciéndose mayor cantidad de LH. En peces que son desovadores parciales parecen tener menores niveles de progesterona y mantienen altas concentraciones de estrógenos circulantes, posiblemente a una yuxtaposición del esteroide asociado con la madurez y la actividad gametogénica (Carrillo, 2009).



**Figura 4.** Diferenciación de un oocito vitelogénico y un oocito maduro, presencia de la zona pelúcida (ZP) y zona granular (ZG)

**Fuente:** (Kiewek, 2009).

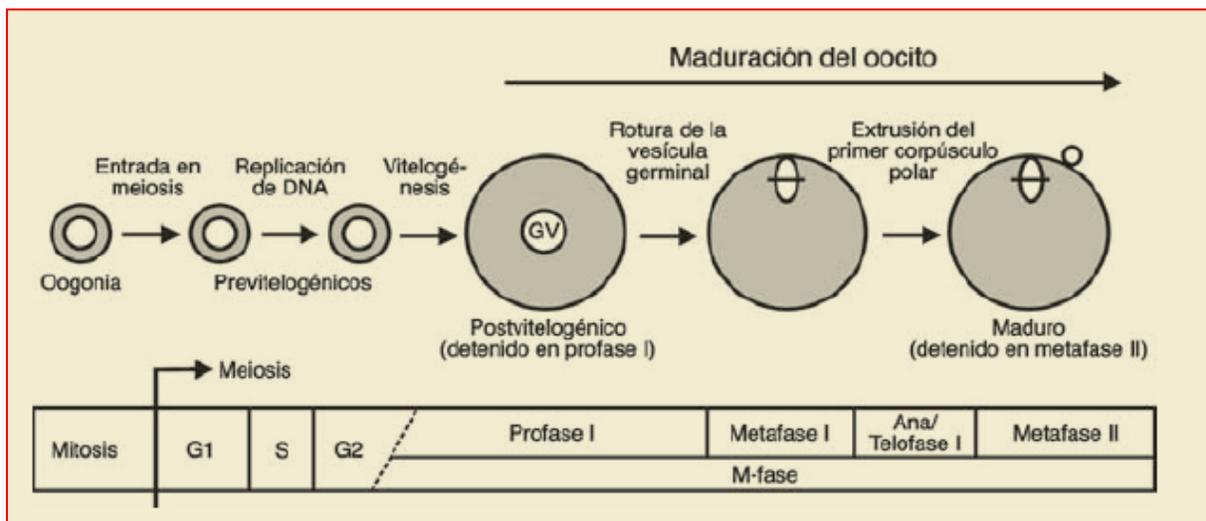
Durante el crecimiento y maduración del ovocito, en el folículo se forma:

- Membranas Primarias, retiene el óvulo después de la ovulación, está compuesta de:
  - Membrana Plasmática y vitelina
- M. Secundaria, retenida por el ovario como formación residual del folículo luego de la ovulación. Está compuesta de:
  - Membranas tecales conjuntivas
  - Membranas de células foliculares o granulosa

- Zona radiata externa
- Zona radiata interna
- Zona estriada celular, con túbulos vacíos que permiten ingreso de nutrientes. Esta membrana se ha ido adaptando a través de la filogénesis del huevo, trayendo consigo cambios en su organización.

### Esquema del crecimiento y maduración del oocito

Los oocitos producidos a partir de la entrada en meiosis de las oogonias detienen el ciclo meiótico celular en la profase I y crecen de tamaño principalmente por la acumulación de vitelo (vitelogénesis). Los oocitos se detienen en profase I, son inmaduros, a la vez que los individuos no han alcanzado la madurez sexual, En respuesta a la señal hormonal en el momento que los individuos han alcanzada la madurez reproductiva los oocitos inmaduros prosiguen la meiosis hasta la metafase II y son ya maduros (Fernández, 2011).



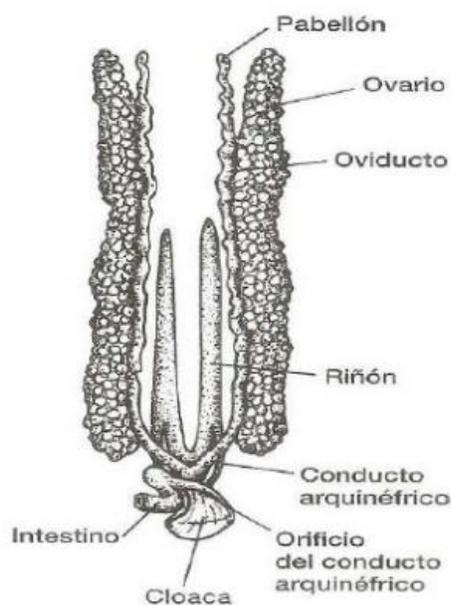
**Figura 5.** Esquema del crecimiento y maduración de ovocito

**Fuente:** (Kiewek, 2009).

## 2.4.2 Estructura gonadal

### 2.4.2.1 Anatomía de los ovarios

Son estructuras en pares, alargadas, con un peso, volumen y coloración definida de acuerdo a su ciclo reproductivo o estadio de desarrollo de las gónadas. Está constituido por tejido conjuntivo, lámelas ovulíferas, células germinativas que comprende las ovogonias, ovocitos pre-vitelogénicos, ovocitos vitelogénicos y ovocitos maduros. El Folículo ovárico está constituido por las capas foliculares: teca y granulosa. El ovocito propiamente dicho está constituido por la zona pelúcida, vesícula germinal o núcleo, gránulos de vitelo y vesículas de vitelo. El ovario de los peces teleósteos, puede ser desde un simple saco, hasta un sistema complejo con funciones específicas para el almacenamiento del esperma, fecundación de los oocitos y como fuente de alimentación en el desarrollo del embrión en casos de ovo-viviparismo (Yzasiga & Zelada, 2017).



**Figura 6.** Anatomía del aparato urogenital de peces hembras  
**Fuente:** (Romero, 2009).

Dependiendo del ritmo de desarrollo de los oocitos en diferentes especies de teleósteos, se han distinguido y caracterizado tres tipos de ovarios:

- Sincronismo: Todos los oocitos crecen y maduran al mismo tiempo de forma paralela. Característico de especies de solo una puesta por vida o anual.
- Sincronismo por grupos: Los oocitos del ovario se agrupan en dos grupos de dos estadios diferentes. Característico de especies de 4-5 puestas por temporada, con intervalo entre puesta y puesta relativamente corto.
- Asincronismo: El ovario del animal presenta todos sus oocitos con estadios de desarrollo independientes careciendo de sincronía. Se caracterizan porque realizan varias puestas durante su largo período de puesta (Fernández, 2011).

#### **2.4.2.2 Estructura del ovocito en peces**

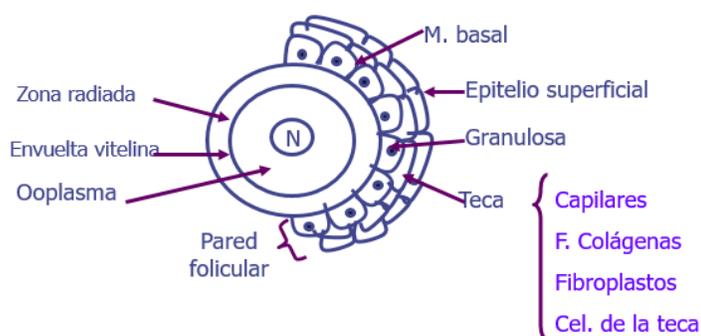
Zona radiata o pelúcida: Está formada por 2 capas celulares, por una capa interior gruesa y capa exterior delgada. La zona radiata está atravesada por poros que permiten que las células del folículo envíen su material al oocito.

Granulosa: Juega un papel fundamental en la formación de esteroides sexuales: Como es el caso de  $17\alpha 20\beta$  Dihidroxipregnenolona ( $17\alpha 20\beta$  DHP) precursora de la maduración de los ovocitos y posterior ovulación. Es importante en la atresia o degradación del oocito.

Ovocito: es la célula germinal femenina derivada de la oogonia y célula sexual de la hembra formado por el núcleo, ooplasma, oolema y zona radiata, las dos últimas mencionadas originan el corion.

Folículo: Es una estructura anatómico-funcional, es parte del ovario y el ovocito es la célula que irá madurando en una parte microscópica de pared interna de un folículo a lo largo del ciclo

ovárico espontáneo, contiene células que producen estrógenos, necesarios para el normal desarrollo de la maduración de los óvulos, está formado por el ovocito y la pared folicular que está compuesta por células de la granulosa, teca y epitelio superficial (Fernández, 2011).



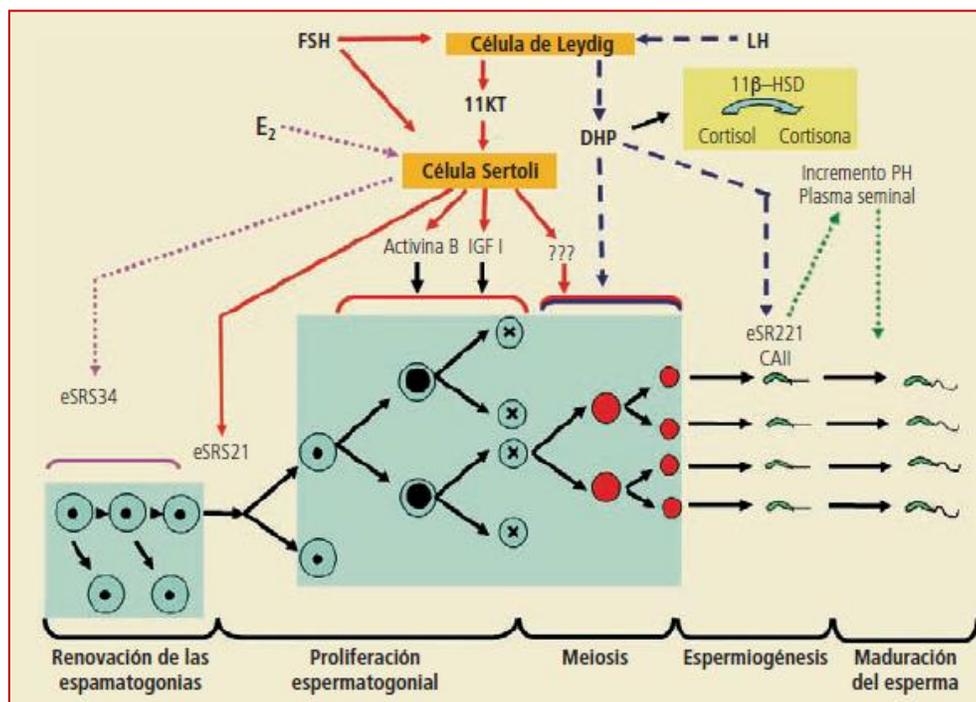
**Figura 7.** Estructuras del ovocito de peces hembra

**Fuente:** (Yzasiga & Zelada, 2017).

### 2.4.3 Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso por el cual un pequeño número de células diploides, las células madre de las espermatogonias, producen un número elevado de células haploides especializadas, los espermatozoides. En peces, las hormonas hipofisarias, hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), estimulan la producción de hormonas esteroideas sexuales en el testículo. Es un proceso que consta en dos etapas proliferativas: renovación de las células madre y proliferación mitótica de las espermatogonias, seguidas por la meiosis y espermatogénesis, durante la cual las espermatogonias haploides se transforman en espermatozoides, vectores genómicos flagelados móviles. De este modo, un pequeño número de células madre espermatogoniales diploides, producen espermatozoides altamente diferenciados que contienen un genoma haploide recombinado. El desarrollo de la espermatogénesis es

regulado por diferentes hormonas que se unen a sus respectivos receptores y por factores de crecimiento (Vázquez, 2012)



**Figura 8.** Proceso de la espermatogénesis

**Fuente:** (Yzasiga & Zelada, 2017).

A continuación, se detallan las principales fases de la espermatogénesis:

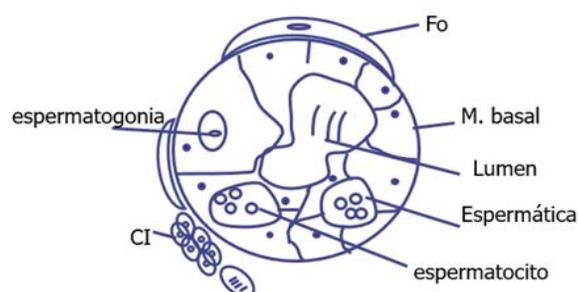
**Fase mitótica:** En esta fase las células germinales se presentan como diferentes generaciones de espermatozonias A, incluidas las células madre germinales y las espermatozonias A diferenciadas. Esta población de células se corresponde con las células madre de la espermatogénesis y se auto-renuevan. La fase mitótica presenta variaciones en el número de tipos celulares que la constituyen en las distintas especies de peces, debido a que el número de mitosis que tiene lugar en la etapa de proliferación y el punto de inflexión, en el cual el proceso de espermatogénesis continúa irreversiblemente hasta la aparición de espermatozoides, son

específicos de cada especie. El inicio de la espermatogénesis conlleva una serie de divisiones mitóticas que producen un aumento en las espermatogonias por quiste que se denominan espermatogonias B (tempranas o tardías) (Gómez, 2012).

Fase meiótica: En esta etapa las espermatogonias B tardías se diferencian en espermatocitos primarios que entran en la profase de la primera división meiótica, produciendo al final de la misma espermatocitos secundarios, estos entran en la metafase de la segunda división meiótica generando, al final de la división, células haploides o espermatidas.

Fase espermiogénica: Aquí las espermatidas haploides se producen una serie de cambios morfológicos que las transforman en espermatozoides. Al final de la espermatogénesis, cuando los puentes intercelulares se han roto y los espermatozoides se han individualizado, las uniones complejas entre las células de Sertoli sufren una alteración que termina con la aparición del quiste y la liberación de los espermatozoides hacia la luz tubular (Kiewek, 2009).

Fase de maduración. En esta fase los espermatozoides adquieren la motilidad y la capacidad de fertilización mientras que en la fase mitótica el número de generaciones de espermatogonias viene determinado genéticamente para cada especie, las otras fases presentan grandes similitudes entre las diferentes especies de peces vertebrados Según progresa la espermatogénesis hay una disminución relativa de quistes de espermatogonias diferenciadas y de espermatocitos y un aumento de quistes de espermatidas y espermatozoides, este proceso varía de acuerdo a cada especie (Gómez, 2012).



**Figura 9.** Estructuras durante proceso de espermatogénesis en peces

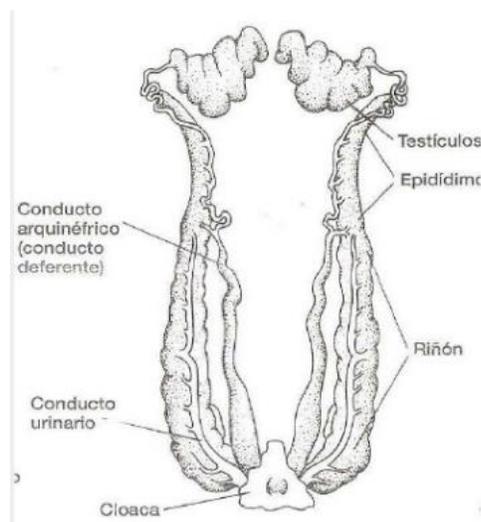
**Fuente:** (Yzasiga & Zelada, 2017).

### 2.4.3.1 Anatomía de los testículos

Los testículos de los peces es un órgano par, alargado que está unido a la parte dorsal de la pared del cuerpo por mesorquio y que están recubiertos por una capa de tejido conectivo llamada cápsula testicular, la túnica albugínea. El testículo conecta con el exterior mediante un conducto deferente que se origina en su región dorsal y que abre al exterior en la papila urogenital y como ocurre en otros peces vertebrados, estos órganos están constituidos por el compartimento germinal y el intersticial, ambos separados por una membrana basal. El primero comprende un epitelio seminífero compuesto por las células germinales y las células somáticas, células de Sertoli. El segundo está compuesto por tejido conectivo que contiene las células esteroideogénicas o células de Leydig, fibroblastos, fibras colágenas, células mioideas, células sanguíneas, vasos sanguíneos y fibras mielíticas (Ureña, González, Triana, & Linares, 2014)

Los testículos presentan una característica particular debido a que pueden organizarse y presentarse siguiendo dos patrones diferentes, el patrón tubular y el lobular. Al igual que ocurre en el resto de especies, las células de Sertoli que forman parte del epitelio germinal ejercen una función de atención y mantenimiento de las espermatogonias. Esta característica sirve para

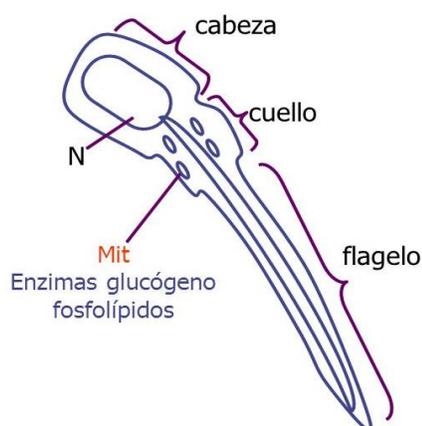
diferenciar peces teleósteos de tetrápodos amniotas, ya que las células de Sertoli contactan con varios clones de células germinales, pero solo puede mantener un determinado número de ellas, mientras que los peces, las células de Sertoli acompañan con porciones citoplasmáticas a estas células germinales, gracias a que las células de Sertoli realizan un proceso de mitosis paralela a estas (Jiménez, 2009).



**Figura 10.** Anatomía del aparato urogenital de peces machos  
Fuente: (Romero, 2009).

La producción de factores como la 11KT y activina B por las células de Leydig tras la estimulación con FSH principalmente, ejerce una importante función reguladora de la espermatogénesis, ejerciendo un control positivo del ciclo cuando estos factores se acumulan en el plasma. El esperma en la mayoría de las especies necesita una capacitación que solo adquiere cuando llega los conductos deferentes o es liberado al medio acuático donde la especie requerirá unos parámetros específicos. Además, se ha podido comprobar que los espermatozoides

presentan en sus membranas receptores para la progesterona, siendo esta un factor que facilita e incrementa la motilidad y maduración final espermática (Fernández, 2011).



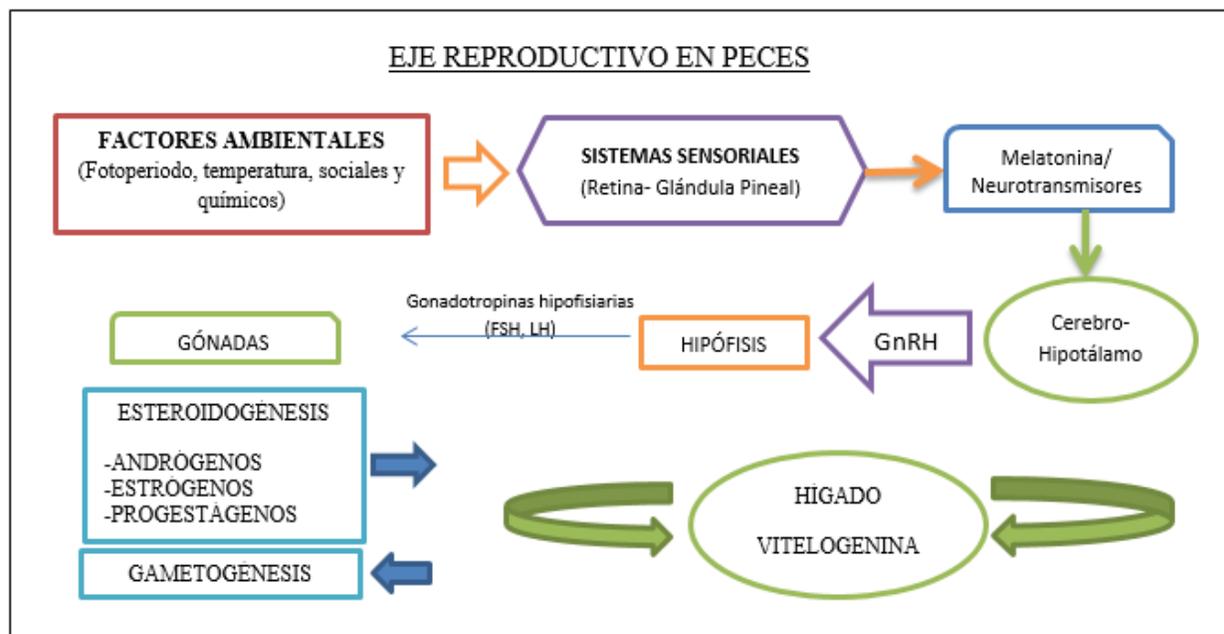
**Figura 11.** Anatomía del espermatozoide maduro de peces machos  
Fuente: (Romero, 2009).

## 2.5 Factores ambientales en la reproducción

Para que la reproducción tenga éxito es preciso que se produzca una sincronización de los reproductores entre sí y de éstos con las variaciones de los factores ambientales. Esta sincronización permitirá que los individuos maduren simultáneamente y en el momento más idóneo para garantizar una mayor supervivencia de la progenie. La sincronización de los individuos con los factores ambientales influye directamente en el ciclo reproductivo de peces teleósteos, estos presentan cambios en sus niveles hormonales en su medio natural, tales como foto-período, temperatura, oxígeno disuelto, pH, salinidad y la disponibilidad de nutrientes (Fernández, 2011).

Los factores ambientales son los responsables de la inducción inicial del desarrollo gonadal, las hormonas producidas por el sistema endocrino son las que controlan éste proceso. El sistema nervioso endocrino actúa conjuntamente para coordinar los eventos reproductivos. La percepción

de estímulos ambientales como el foto-período y la temperatura entre otros está regida por el sistema nervioso e incluye el paso desde los receptores sensoriales al cerebro (Jiménez, 2009).



*Figura 12.* Esquema del eje reproductivo en peces

## 2.6 Esteroides sexuales

Las hormonas esteroideas sexuales son sintetizadas en las gónadas debido al estímulo de las gonadotropinas y posteriormente depositadas en el torrente sanguíneo para su focalización y efecto.

Los esteroides más estudiados son Estradiol (E2), Testosterona (T) y 11-Ketotestosterona (11-KT). Las concentraciones de estos esteroides en el plasma sanguíneo permiten tener un control reproductivo del pez en el eje hipotálamo-gónada (Kiewek, 2009).

### **2.6.1 Los andrógenos**

En los machos se sintetizan en las células de Leyding, son fundamentales para la gametogénesis, el control reproductivo y desarrollo de caracteres sexuales secundarios. Testosterona (T) y 11-Ketotestosterona son fundamentales para el dimorfismo sexual de los peces. La T es producida dentro de la gónada y es precursora de la 11-KT. Los niveles más altos de T y 11-KT se encuentran en concentraciones elevadas durante la época reproductiva coincidiendo con la presencia de espermatozoos, el incremento es prologando durante la gametogénesis y desove (Jiménez, 2009).

### **2.6.2 Estrógenos**

El estradiol E2 es el responsable de la diferenciación sexual de las hembras, a su vez se relaciona con el comportamiento reproductivo. Los bajos niveles de E2 tienen como consecuencia la interrupción del proceso de vitelogénesis que se traduce en la degradación de los ovocitos y en ciertos casos al desarrollo de testas. El precursor de la E2 es la T, en el proceso de síntesis se involucra las células de la teca y granulosa, además de ser un factor para la producción de esteroides durante la maduración sexual de los peces. La E2 estimula la producción de VTG además del incremento de la LH. La E2 a nivel gonadal estimula el desarrollo y crecimiento de los ovocitos (Fernández, 2011).

## **2.7 GnRH (a): caracterización**

Los análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) tienen capacidad de unirse con mayor afinidad al receptor de GnRH de forma que producen una supresión hipofisaria tras un aumento inicial en la liberación de gonadotropinas. Las ventajas que presentan este tipo de fármacos es que minimizan los picos prematuros de LH, disminuyen el número de ciclos

cancelados por ovulaciones endógenas, permiten programar la fecha de la punción folicular y consiguen un desarrollo folicular sincrónico. Sin embargo, su uso provoca insuficiencia del cuerpo lúteo, presentan mayores tasas de cuadros de híper-estimulación ovárica y hacen necesario el uso de mayores dosis de gonadotropinas (Cisneros, 2007).

La manipulación del control ambiental para reproducir peces silvestres en cautiverio es factible en pocas especies, por ello, el uso de métodos químicos resulta ser una alternativa ante esta limitación. Estos métodos están basados en el mecanismo secuencial hipotálamo-hipófisis-gónada, mecanismo que puede ser controlado en cada uno de sus tres niveles, inhibiendo o promoviendo respuestas en el proceso reproductivo. Desde la década de 1930 hasta mediados de 1970 se desarrollaron técnicas de hipofisación. Estas técnicas consisten en inyectar CPE (extracto de pituitaria de carpa), SPE (extracto de pituitaria de salmón) y/o cualquier extracto a partir de hipófisis de peces para inducir la maduración final y el desove. A partir de 1970 se empezaron a desarrollar técnicas que estimulan la producción de gonadotrofinas endógenas por la hipófisis del pez inducido. Estas técnicas están basadas en el uso de hormonas liberadoras de gonadotrofinas (GnRH) de mamíferos o análogos estructurales de ellas. Experimentos en laboratorio han comprobado que los GnRH análogos (GnRHa) son más efectivos que los GnRH nativos debido a la modificación en su estructura molecular, la cual evita la degradación de la hormona por acciones enzimáticas (Cruz, Velasco, & Medina, 2006)).

Las gonadotrofinas obtenidas de mamíferos utilizadas en la inducción de peces pueden ser hipofisarias (LH, hormona luteinizante; FSH, hormona folículo estimulante) o placentarias (HCG, gonadotrofina coriónica humana; PMSG, gonadotrofina sérica de yegua preñada),

mientras que las gonadotrofinas provenientes de peces son de origen hipofisiario y son la GtH-I y GtH-II, funcionalmente homólogas a la FSH y LH, respectivamente (Cisneros, 2007).

### **2.7.1 Aplicaciones de GnRH (a)**

La aplicación de GnRH análoga es para inducir al desove y espermiación de especies acuícolas en cautiverio. Espinoza, (2010) afirma haber implementado el proyecto “Inducción del desove y espermiación de anchoveta peruana *Engraulis ringens* (Jennyns, 1842) en cautiverio mediante la inyección de un análogo de GnRH”. La finalidad fue obtener desoves de ejemplares de *Engraulis ringens* en cautiverio para realizar pruebas experimentales con huevos y larvas; en el proyecto se evaluó el efecto de inyecciones de acetato de buserelina (un análogo de GnRH; GnRHa) sobre desove y espermiación. Además, se utilizó domperidona (DOM) para eliminar un posible control dopaminérgico en la liberación de gonadotropinas endógenas en esta especie. Se inyectaron intraperitonealmente ejemplares maduros con 0,005  $\mu\text{g}$  GnRHa g<sup>-1</sup> pez (GnRHa); 0,005  $\mu\text{g}$  GnRHa g<sup>-1</sup> pez + 0,01 mg DOM g<sup>-1</sup> pez (GnRHa+DOM) o solución salina a 0,9% (SS). Hubo un efecto inductor de los tratamientos con GnRHa y GnRHa+DOM sobre el desove. Los desoves ocurrieron entre 24 y 48 h post-inyección (p.i.) y los porcentajes totales fueron 57,3% y 20,9% con GnRHa y GnRHa+DOM respectivamente, los cuales fueron significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ). El efecto de la hormona sobre la expulsión de semen fue inmediato en el tratamiento con GnRHa (44,4%), siendo el porcentaje de machos expulsantes a 0 horas p.i. significativamente diferente al control (0 %) ( $P < 0,05$ ). El máximo porcentaje de machos expulsantes se observó a las 12 horas p.i., siendo 85,7% con GnRHa y 75,0% con GnRHa+DOM, entre los cuales no se encontró diferencias significativas ( $P > 0,05$ ).

El proyecto “Efecto de la inyección de un análogo de GnRH sobre la maduración final ovocitaria y perfiles plasmáticos de esteroides gonadales en anchoveta peruana (*Engraulis ringens*)” cuya finalidad fue determinar el efecto de un análogo de GnRH sobre la maduración final ovocitaria y los perfiles plasmáticos de testosterona (T),  $17\beta$  Estradiol (E2) y  $17\alpha$ ,  $20\beta$  dihidroxiprogesterona ( $17\alpha$ ,  $20\beta$  DP) en ejemplares de *E. ringens*. Los individuos para este estudio fueron capturados en la Bahía del Callao, en su ambiente natural y fueron acondicionados al cautiverio en tanques de 10 m<sup>3</sup> con aeración constante, temperatura del agua de 16 °C, recirculación de agua de mar y alimentación ad libitum durante un período de un mes, para su aclimatación. Una vez que los peces alcanzaron la madurez gonadal, se procedió a inyectarles 0,005  $\mu$ g GnRH<sub>a</sub> g<sup>-1</sup> de peso corporal; 0,005  $\mu$ g GnRH<sub>a</sub> g<sup>-1</sup> de peso corporal + 0,01 mg DOM g<sup>-1</sup> de peso corporal y 0,9 % de solución salina. Como GnRH<sub>a</sub> se empleó acetato de buserelina y como antidopaminérgico se empleó domperidona. Transcurridas 0, 12, 24 y 48 h post inyección (pi) grupos de peces fueron sacrificados con la finalidad de extraer las gónadas y colectar la sangre para determinar el efecto de la hormona sobre la maduración final ovocitaria. Los resultados obtenidos determinaron que la inyección de acetato de buserelina a 0,005  $\mu$ g g<sup>-1</sup> de peso corporal induce la maduración final ovocitaria en hembras maduras de *E. ringens* 12 horas pi, culminando con el desove entre las 24 y 48 horas (Cisneros, 2007).

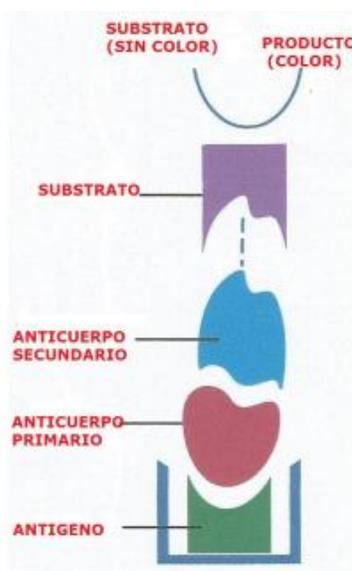
## **2.8 Técnicas de Inmunodetección ELISA**

Los test de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: ‘ensayo por inmuno adsorción ligado a enzimas’) son ensayos in vitro utilizados para la medición de anticuerpos y antígenos. La técnica de ELISA ha sido diseñado para detectar un anticuerpo (Acs) dirigido contra un antígeno. Permite determinar la concentración de una molécula (o antígeno) con alta sensibilidad.

Se inmoviliza el antígeno a detectar o los anticuerpos específicos sobre el fondo de un pocillo de plástico, y, posteriormente se lleva a cabo la detección con Acs unidos a enzimas, mediante un lector de placas de ELISA (Ortega, 2015)

### 2.8.1 Antígenos

Un antígeno es una sustancia extraña al organismo, que induce la formación de anticuerpos por parte de los linfocitos, como medio de defensa de un individuo. Mientras que un anticuerpo es una sustancia que produce el sistema inmunológico ante la presencia de un agente extraño. Ambos componentes, antígeno y anticuerpo, interactúan mediante epítopes, que son componentes del antígeno, a estos se une un determinado anticuerpo por afinidad para producir distintas reacciones en el organismo (Ortega, 2015).



**Figura 13.** Esquema de la técnica ELISA  
**Fuente:** (FAO, 2018).

## **2.8.2 Respuesta inmunitaria**

Respuesta humoral: Se producen anticuerpos a través de las células plasmáticas, que se unen a los antígenos para producir reacciones que destruirán a los antígenos para luego ser fagocitados por los macrófagos. Este tipo de respuesta se genera frente a organismos extraños. Respuesta celular: este tipo de respuesta es algo ineficaz para destruir a antígenos que se encuentran dentro de las células del organismo, pues consiste en la destrucción de las células que poseen a los microorganismos extraños para evitar su proliferación, de este modo pueden destruir células tumorales (Ortega, 2015)

## **2.8.3 Tipos de ELISA**

### **2.8.3.1 ELISA directo**

Los pocillos se recubren con la solución donde se encuentra el antígeno a detectar, y a continuación, la placa se incuba con Acs específicos frente a dicho antígeno, conjugados a una enzima. Tras lavar para eliminar aquellos anticuerpos no unidos, se lleva a cabo la reacción colorimétrica. La coloración que aparece es proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra (González, 2017).

### **2.8.3.2 ELISA indirecto**

Los pocillos se recubren con el antígeno, pero primero se incuban con Acs primarios no marcados específicos frente al antígeno, y, a continuación, después de lavados, la placa se incuba con Acs secundarios frente a los primarios, conjugados a una enzima. Presenta mayor sensibilidad que el ensayo directo, ya que a cada Ac primario se le pueden unir varios Acs secundarios, amplificando la señal. Este ensayo es útil para la cuantificación de Acs en una muestra (González, 2017).

### **2.8.3.3 ELISA tipo «sándwich»**

Esta variación utiliza dos tipos de Acs, los dos son específicos frente al antígeno. Los pocillos se recubren con Acs primarios específicos. Tras bloquear y lavar la placa, se incuba con la muestra donde se encuentra el antígeno a detectar, y, después de múltiples lavados, se incuba con Acs conjugados a enzimas dirigidos frente a un epítoto diferente del antígeno seguido de otra incubación con Acs secundarios marcados. Esta variación de ELISA presenta bastante especificidad y es útil para detección y cuantificación de moléculas grande (Luna, 2013).

### **2.8.3.4 ELISA competitivo**

Es el Elisa más sensible y versátil, el antígeno o anticuerpo se adhieren al plástico y va a existir una competencia por aquellos que estén en solución, marcados o no con enzima. En el proceso de lavado se retiran aquellos anticuerpos que reconocen al antígeno en forma soluble y por tanto la señal detectada en el pocillo será inversamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra. Es una técnica útil para la detección y cuantificación de moléculas pequeñas (Gómez, 2012)

## **2.8.4 Fundamento para la detección de Estradiol**

El estradiol (E2) es una hormona esteroidal producida a partir de la testosterona a través de la aromatasa en las células de la granulosa de los folículos ováricos. El estradiol es un factor que permite el desarrollo de características sexuales secundarias en los individuos. El fundamento para la detección se basa en la competencia entre el estradiol nativo y un estradiol conjugado de acetilcolinesterasa (AChE) (Estradiol AChE Tracer) por un tiempo limitado con cantidad de antisuero de estradiol. Porque la concentración de Estradiol AChE se mantiene constante

mientras que la concentración de estradiol nativo varía, la cantidad de Estradiol AChE Tracer que puede unirse al antisuero de Estradiol será inversamente proporcional a la concentración de estradiol nativo en el pocillo. Este complejo anticuerpo-estradiol se une a la IgG monoclonal de ratón anticonejo que se ha adjuntado previamente al pocillo. La placa se lava para eliminar cualquier reactivos no unidos y reactivo de Ellman's que contiene el sustrato a AChE, el cual se agrega al pocillo. El producto de esta reacción enzimática tiene un color amarillo distintivo color y absorbe fuertemente a una longitud de onda de 414 nm. La intensidad de este color, determinada espectrofotométricamente, si es proporcional a la cantidad de Estradiol AChE Tracer unido al pocillo, que es inversamente proporcional a la cantidad de estradiol nativo presente en el pocillo durante la incubación (Luna, 2013).

## **2.9 Histología gonadal**

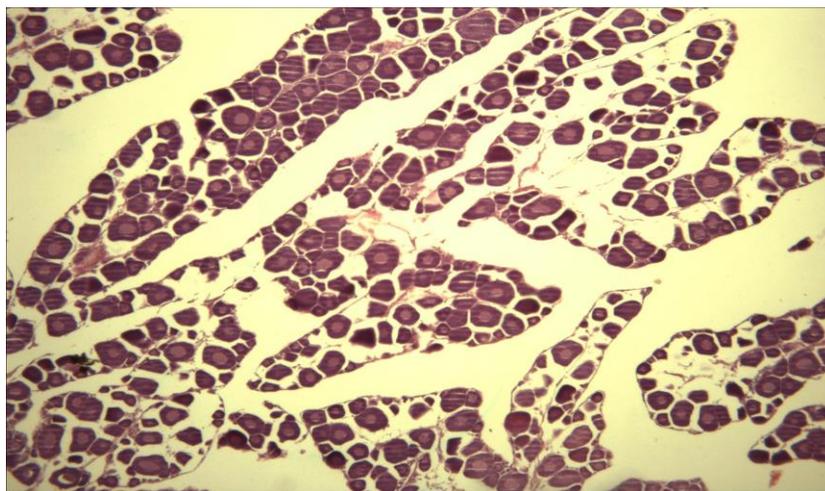
La histología estudia la composición estructural de los tejidos de un organismo, además permite realizar una descripción de los elementos funcionales en la fisiología de los sistemas de un individuo, además del entendimiento de las alteraciones morfológicas y funcionales de los tejidos estructurales. Así mismo, la captación en profundidad con base en un buen conocimiento de la relación entre estructura, composición molecular y función. Los estudios histológicos de los gametos, permiten un análisis detallado y preciso del cambio que presentan en las etapas de desarrollo, lo que permite determinar tallas medias de madurez, las que sirven como soporte para establecer las tallas medias de captura de los peces y de esta manera realizar una pesca sostenible, permitiendo la reproducción de las especies de interés. La importancia de la histología gonadal en vieja roja *Cichlasoma festae* permite determinar las tallas de madurez sexual, cuando son aptas

para la reproducción, logrando la supervivencia de especies amenazadas cómo es *Cichlasoma festae* (Castro, 2011).

## 2.9.1 Estadíos gonádicos hembras

### 2.9.1.1 Estadío I

En el estadio I de inmadurez no se puede distinguir entre ovarios y testículos, su apariencia es de sacos muy delgados y traslúcidos, mientras que en el caso de las hembras es posible observar células foliculares (Peña, Gómez, & García, 2011)

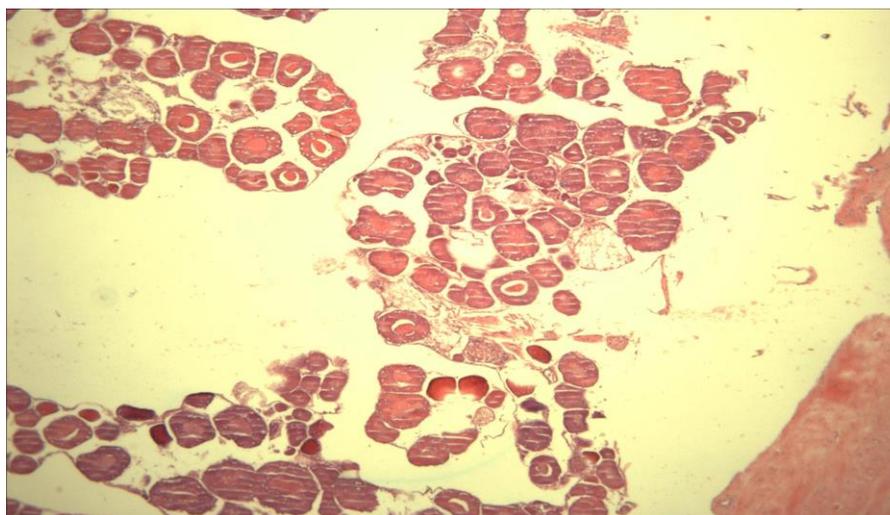


**Figura 14.** Corte histológico de ovarios de *M. australis* en etapa de desarrollo Crecimiento primario. (100x) Tinción H&E  
**Fuente:** (Castro, 2011).

### 2.9.1.2 Estadío II

Los ovarios están en etapa de maduración y se distingue dos tamaños en los ovocitos: 100-1 000  $\mu\text{m}$  y de 1 001-2 000  $\mu\text{m}$  con número variable de folículos. En este estadio se observan folículos en etapa de previtelogénesis, es decir, presentan un núcleo prominente, céntrico y citoplasma basófilo, además de folículos en vitelogénesis temprana. Los dos tipos de folículos están rodeados por una capa simple de células aplanadas o conocidas cómo células de la teca y

otra capa de células cúbicas o conocidas como células de la granulosa, además de esto se puede apreciar la zona pelúcida y el citoplasma, que en este estadio es altamente basófilo; el núcleo o vesícula germinal se caracteriza por ser prominente y céntrico con numerosos nucléolos en la periferia (Peña, Gómez, & García, 2011).

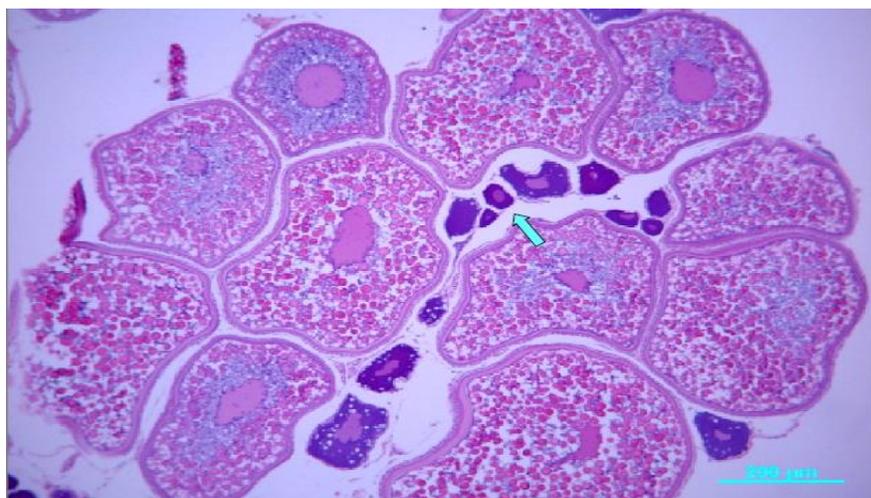


**Figura 15.** Corte histológico de ovarios de *M. australis* en etapa de desarrollo Alveolo cortical. (100x) Tinción H&E  
**Fuente:** (Castro, 2011).

### 2.9.1.3 Estadío III

Para el estadio III los ovocitos están maduros, los folículos se clasifican en tres tamaños, de 100 a 1 000  $\mu\text{m}$ , de 1 001 a 2 000  $\mu\text{m}$  y de 2 001 a 3 000  $\mu\text{m}$ . Este estadio se caracteriza por la presencia de folículos tanto en etapa de previtelogénesis como en etapas de vitelogénesis temprana y avanzada. Debido a que el ovario se encuentra en la etapa de maduración, se puede apreciar la presencia de folículos atrésicos, los cuales no son propios de este estadio, el fenómeno se puede presentar en cualquiera de las etapas del desarrollo del folículo. Se distingue la pared del folículo dividida en tres capas: externa o células de la teca; la media o membrana basal e interna o células de la granulosa que está compuesta de epitelio cúbico-ciliado, seguida del tejido

conjuntivo que sirve de sostén a los folículos. La capacidad del ovocito para ingresar en la maduración está acompañada del incremento de las uniones intracelulares entre las células de la granulosa e intercelulares entre las células de la granulosa y el ovocito. Además de la síntesis de Conexina, la cual es una proteína constitutiva de estas uniones (Peña, Gómez, & García, 2011).

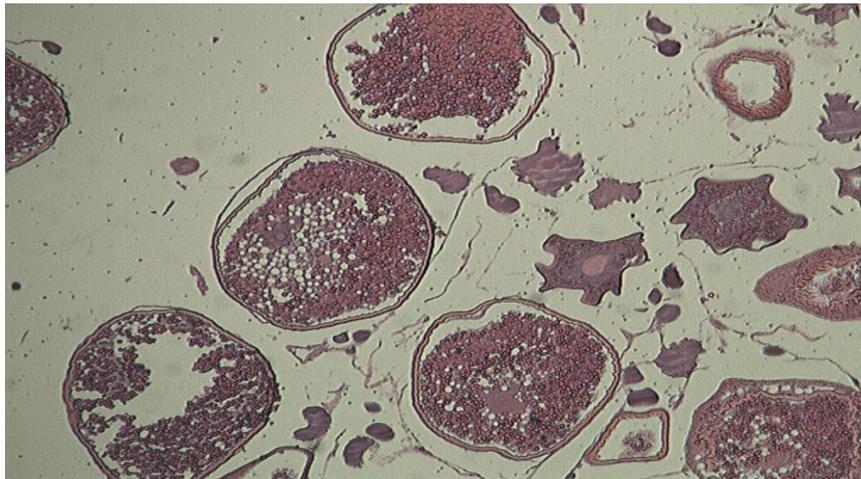


**Figura 16.** Corte histológico de ovarios de *M. australis* en etapa de Vitelogénesis  
**Fuente:** (Castro, 2011).

#### 2.9.1.4 Estadío IV

Es la etapa de máxima maduración o ya de reproducción y en ella se distinguen dos tamaños de folículos, de 100 a 1 000  $\mu\text{m}$  y de 2 001 a 3 000  $\mu\text{m}$ . Los folículos completan el crecimiento vitelogenético y aumentan considerablemente su tamaño; en ellos se observa que las células foliculares se han transformado en una capa sencilla. En esta etapa, la vesícula germinal migra hacia el polo animal del folículo, los cromosomas se condensan y se emite el primer cuerpo polar. Es posible observar folículos pequeños en etapa de previtelogénesis, propios del estadío I. El folículo está ocupado casi en su totalidad por gránulos de vitelo y vacuolas lipídicas, el tejido

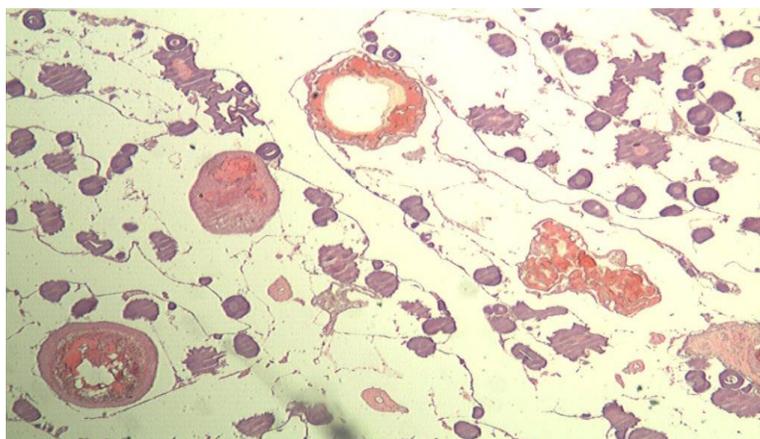
conjuntivo se ha reducido al mínimo y la zona pelúcida se mantiene notoria (Peña, Gómez, & García, 2011).



**Figura 17.** Corte histológico de ovarios de *M. australis* en etapa de desarrollo Maduración (maduros). (40x) Tinción H&E  
**Fuente:** (Castro, 2011).

#### 2.9.1.5 Estadío V

Es el estadío de recuperación, los ovocitos son expulsados del lumen ovárico y están listos para ser fertilizados. El ovario muestra paredes flácidas, translúcidas o sanguinolentas, con dos tamaños de folículos: 100-1 000 y 2 001-3 000  $\mu\text{m}$ , con mayor presencia de folículos pequeños y pocos o ausencia de los folículos más grandes (Peña, Gómez, & García, 2011).



**Figura 18.** Corte histológico de ovarios de *M. australis* en etapa Desovados. (40x) Tinción H&E  
**Fuente:** (Castro, 2011).

## 2.9.2 Estadíos gonádicos machos

### 2.9.2.1 Estadío I

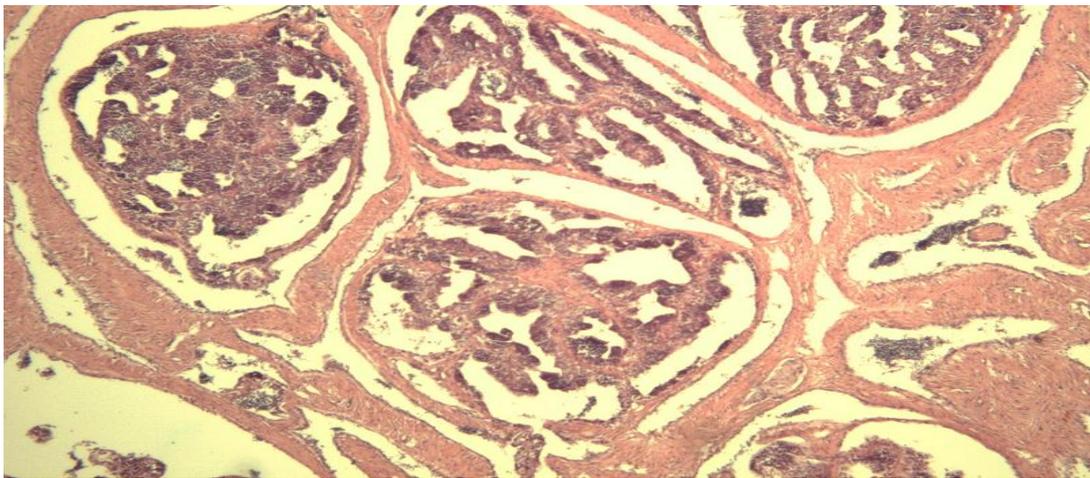
En este estadio no es posible diferenciar los testículos de los ovarios a simple vista; sin embargo, las gónadas inmaduras presentan forma de filamentos translúcidos paralelos a la vejiga natatoria. Además, presentan un revestimiento de tejido conectivo y vasos sanguíneos que se proyectan hacia el interior formando los septos que separan los lóbulos (Peña, Gómez, & García, 2011).



**Figura 19.** Corte histológico de testículos de *M. australis* en estado Inmaduros  
**Fuente:** (Castro, 2011).

### 2.9.2.2 Estadío II

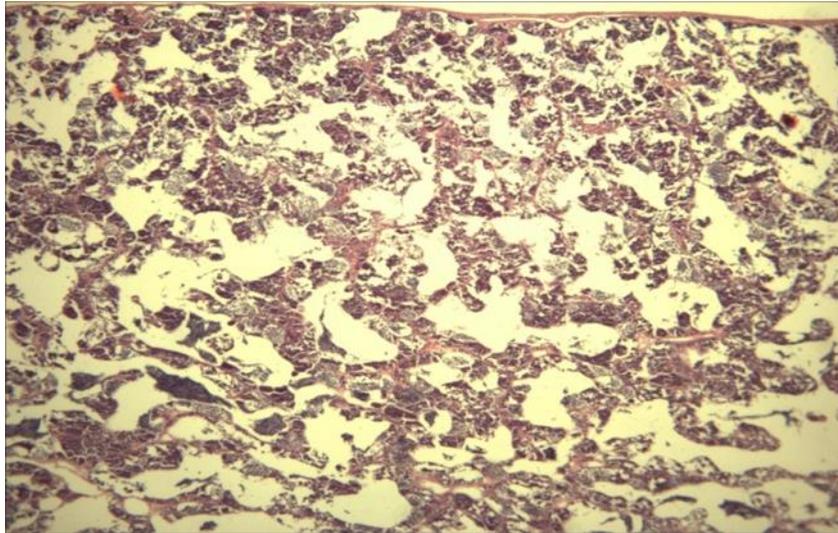
En este estadio de desarrollo los testículos pueden ocupar entre 10% y 20% de la cavidad celómica, es posible observar algunas espermatogonias, tienen en forma redondeada, acidófila, las cuales son las más abundantes, además espermatocitos primarios, secundarios y algunas espermatidas y espermatozoides en los lóbulos (Peña, Gómez, & García, 2011).



**Figura 20.** Corte histológico de testículo de *M. australis* en estado de desarrollo Espermatogénesis. (40x) Tinción H&E. (→) Espermatidas  
**Fuente:** (Castro, 2011).

### 2.9.2.3 Estadío III

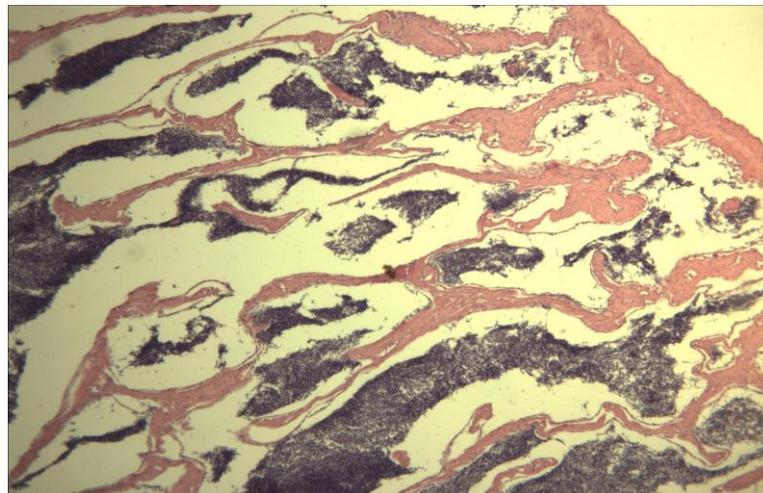
En este estadio de maduración es posible observar que los lóbulos se encuentran llenos de células espermatogénicas, además de que los espermatozoides comienzan su migración hacia los conductos eferentes (Peña, Gómez, & García, 2011).



**Figura 21.** Corte histológico de testículos de *M. australis* en estado Espermiogénesis. (40x) Tinción H&E  
**Fuente:** (Castro, 2011).

#### 2.9.2.4 Estadío IV

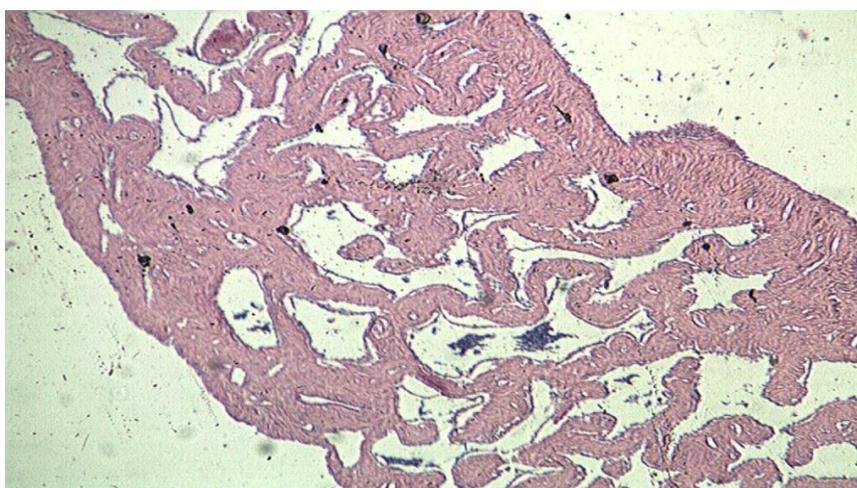
En este estadío de desove los lóbulos seminíferos están totalmente llenos de espermatozoides. El tejido conjuntivo es poco y no se observa otras fases de desarrollo de células espermáticas (Peña, Gómez, & García, 2011).



**Figura 22.** Corte histológico de testículos de *M. australis* en estado Espermiación. (40x) Tinción H&E  
**Fuente:** (Castro, 2011).

### 2.9.2.5 Estadío V

En este estadío los testículos, en los cuales se ha producido la espermiación, se observa que los lóbulos se encuentran vacíos y que existe alguna cantidad residual de espermatozoides en el lumen. Durante la maduración del testículo la longitud y el diámetro se incrementan conforme la maduración se lleva a cabo (Peña, Gómez, & García, 2011).



**Figura 23.** Corte histológico de testículos de *M. australis* en estado Desovado. (40x) Tinción H&E  
**Fuente:** (Castro, 2011).

### 2.10 Sistema de Recirculación (RAS)

Los sistemas de recirculación de acuicultura RAS, son instalaciones acuícolas que reutilizan el agua mediante un ciclo cerrado, mediante un sistema de filtración que permite que pueda ser utilizada nuevamente. Se utiliza el recurso agua de forma sostenible en las operaciones acuícolas, RAS reduce la cantidad de agua y espacio necesarios para la acuicultura. Las instalaciones basadas en RAS han crecido en la actualidad y a gran escala en el sector acuícola mundial y nacional, año tras año. El mayor uso de estos sistemas representa un cambio para la acuicultura, ya que se están convirtiendo en el estándar, viendo los beneficios que se presentan en este tipo de

sistemas ya que se tiene un mejor control del agua que ingresa al sistema, mejorando notablemente el ciclo de vida de muchas especies (Sedano & Anguis, 2016)

Los sistemas de recirculación de agua, pueden ser totalmente controlados y ofrecen una serie de ventajas y oportunidades. Primero, alivia la necesidad de que la acuicultura se encuentre en un ecosistema ambiental que complemente a la especie. Esto permite la conveniencia de la diversidad con la especie y la ubicación. Segundo, mejora la salud general y el crecimiento de la especie, expresando su máximo potencial, debió a un control en la calidad del agua para garantizar que las condiciones sean óptimas para la especie a cultivarse. Algunos de los parámetros que se monitorean regularmente incluyen oxígeno, dióxido de carbono, pH, temperatura, nitrito, nitrato y amoníaco. Finalmente, RAS también requiere muy poca agua y espacio, lo que los hace mucho más sostenibles en comparación con los métodos tradicionales (Skretting, 2018).

### **2.10.1 Calidad de agua en sistema de recirculación (RAS)**

Una buena calidad de agua representa bienestar animal, aumento en la calidad y mejores tasas de crecimiento. Por lo cual se pueden tomar diferentes aspectos a consideración como son las variables físicas, químicas y biológicas; se debe considerar que se habla de buena calidad de agua mientras se mantenga dentro de los rangos óptimos ya que en caso contrario se mantendrá a los peces en una situación estresante y generando un gasto energético para la adaptación. Entre las principales variables encontramos la temperatura, oxígeno, el pH, compuesto de nitrógeno y microbiología (Skretting, 2018).

### **2.10.1.1 Temperatura**

En los peces la temperatura corporal varía de acuerdo al medio con el que les rodea ya que no posean el mecanismo de termorregulación. A mayor temperatura los peces presentan un proceso más eficiente de alimento, lo que conllevó a un incremento de peso y de crecimiento; lo que también puede causar que sufran de patologías. Se debe procurar en mantener la temperatura del agua dentro de los rangos óptimos de acuerdo a la especie (FAO, 2018).

Se debe de considerar que al existir un aumento de la temperatura a la vez produce un incremento del metabolismo del cultivo, aumento de la tasa de respiración que conlleva a su vez el incremento del consumo de oxígeno. Por cada 10 °C de incremento de temperatura aproximadamente, la tasa de respiración tiende a duplicarse. Se recomienda evitar variaciones bruscas (más de 5°C) de temperatura para disminuir el estrés de los peces, que puede llegar a una reducción de las tasas de ingestión y deprimir el sistema (Skretting, 2018).

### **2.10.1.2 Oxígeno**

Los sistemas RAS requieren de oxígeno durante todo el tiempo para la respiración de peces y bacterias del sistema de nitrificación, las cuales son las encargadas de oxidar los desechos nitrogenados que producen los peces. El oxígeno es una de las variables que más cambia en el sistema, pudiendo tener niveles óptimos y críticos que afectan el desempeño de los peces, que necesitan oxígeno para asimilar el alimento, de manera que niveles bajos de oxígeno provocan inapetencia y por ello menores tasas de conversión alimenticia y menor crecimiento. A mayor temperatura, menos oxígeno disuelto habrá en el agua. Además, durante la alimentación, los peces aumentan su metabolismo y por tanto incrementan su consumo de oxígeno (Skretting, 2018).

### **2.10.1.3 pH**

El pH mide la concentración de iones  $H^+$  en el agua y afecta a los procesos biológicos de los peces y el sistema de nitrificación del sistema RAS. En una escala de 0 a 14, tal, los peces pueden tolerar un rango de pH entre 6 y 9,5. Es muy importante para el bienestar de los peces controlar los niveles de pH en el cultivo debido a que pequeños cambios de pH supondrá grandes cambios en las concentraciones de protones (Sedano & Anguis, 2016).

### **2.10.1.4 Compuestos de Nitrógeno**

En un sistema RAS la acumulación de los residuos nitrogenados se debe principalmente a la descomposición bacteriana del alimento y excretas de peces. El principal desecho es el amoníaco ( $NH_4$ ). El amoníaco es transformado a nitrito ( $NO_2^-$ ) y posteriormente a nitrato ( $NO_3^-$ ) por las bacterias nitrificantes en el proceso de nitrificación. Las bacterias que son parte del proceso de nitrificación se encuentran principalmente en el biofiltro del sistema (Skretting, 2018).

Se recomiendan los siguientes rangos de los compuestos para mantener una buena calidad de agua:

- $NH_4 < 0,05$  mg/l
- $NO_2 < 0,5$  mg/l
- $NO_3 < 50$  mg/l

En caso de la acumulación de estos compuestos nitrogenados representa implicaciones negativas sobre el bienestar de los peces, donde podemos encontrar:

- La acumulación de amoníaco puede provocar daño branquial, menor fecundidad y tener efectos negativos en el sistema nervioso e inmune.

- La acumulación de nitrito puede provocar la enfermedad de la sangre marrón, afectando mucho a su capacidad para respirar.
- La acumulación de nitrato puede afectar el órgano del equilibrio de los peces, su apetito y provocar fatiga y nado errático en los peces.

### **2.11 Titulación de grado**

La titulación de grado “Evaluación de la GnRH análoga de salmón en la maduración gonadal de peces adultos de *Cichlasoma festae* en la hacienda El Prado” es financiado con fondos de la convocatoria INEDITA-SENESCYT, período 2018 para su ejecución en el 2019. El proyecto nace en base a una necesidad de la comunidad piscícola de la provincia de los Ríos, Santo Domingo de los Tsáchilas y noroccidente de la provincia de Pichincha. Las comunidades de la rivera de la cuenca alta del río Guayas, han visto disminuido las pesquerías locales, debido a diversos factores, entre ellos la acción antropogénica, el aumento de la pesquería local generando una pérdida de las poblaciones de vieja azul y roja de su ambiente natural.

La finalidad del proyecto es la transferencia de paquetes tecnológicos que se puedan implementar en pesquerías de pequeña y mediana escala de las provincias ya mencionadas.

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Ubicación del Lugar de Investigación

##### 3.1.1 Ubicación Política

El estudio se realizó en el invernadero cuarentenario de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA 1 ubicada en la provincia de Pichincha, Cantón Rumiñahui, Parroquia San Fernando, hacienda El Prado

##### 3.1.2 Ubicación Geográfica del Experimento

La fase experimental del proyecto se llevó acabo en el invernadero inteligente y laboratorio de Recursos Acuáticos y acuicultura de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA I; con las siguientes coordenadas geográficas: Longitud  $78^{\circ} 24' 52,8''$  (W), latitud  $0^{\circ} 23' 5,5''$  (S) y una altitud de 2748 msnm.



**Figura 24.** Ubicación del área del Invernadero cuarentenario del IASA I  
**Fuente:** (Google maps, 2019).

### **3.1.3 Condiciones ambientales**

La hacienda El Prado se encuentra en el piso altitudinal Montano Bajo y el límite entre los pisos zoo geográficos temperado y alto-andino. Presenta una temperatura 13.89 °C (promedio anual), precipitación anual 1285 mm/año y humedad relativa promedio 69.03 % (promedio anual).

## **3.2 Materiales**

### **3.2.1 Materiales Biológicos**

#### **3.2.1.1 Proyecto multipropósito Baba**

Las muestras colectadas (peces) se extrajeron del embalse del Proyecto multipropósito Baba, geográficamente ubicado aguas debajo de la confluencia de los ríos Baba y Toachi. Esta región se caracteriza principalmente por el desarrollo agropecuario. El volumen de descarga anual en ésta cuenca hidrográfica es de 3513000000  $hm^3$ , es un caudal equivalente promedio anual de 111 40  $m^3$ /segundo de los cuales son aprovechados 2773000000  $m^3$  (Barriga, 2011)

El principal objetivo de este proyecto es la generación de energía hidroeléctrica usando los 2773000000  $m^3$ , la reducción de inundaciones en las comunidades que se encuentran aguas abajo y mantener el riego en 8600 has situadas abajo del embalse permitiendo de esta manera una economía sostenible y mejorando la calidad de vida en la población aledaña (Barriga, 2011).

Las especies acuáticas encontradas en el sistema hídrico se encuentran distribuidos en seis ordenes, donde el orden Characiformes es el más diverso con nueve familias y 14 especies; en general podemos encontrar las siguientes familias que son Characidae, Bryconidae, Loricariidae, y Eleotridae con tres especies cada una, otro orden importante es los Perciformes con la familia Cichlidae los órdenes con menos especies son: Pleuronectiformes, Cyprinodontiformes y

Gymnotiformes con una familia y una especie cada uno respectivamente (Revelo & Laaz, 2012).

A continuación, encontramos las siguientes especies:

**Tabla 1**

*Especies Acuáticas existentes en el sistema hídrico del Proyecto Multipropósito Baba*

ORDEN	FAMILIA	NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMÚN
	Prochilodontidae	<i>Ichthyoelephans humeralis</i>	Bocachico
	Anostomidae	<i>Leporinus ecuadorensis</i>	Ratón
		<i>Astyanax festae</i>	Cachuela
	Characidae	<i>Bryconamericus brevirostris</i>	Cachuela
		<i>Rhoadsia altipinna</i>	Chavelita
	Serrasalmidae	<i>Piaractus brachypomus</i>	Cachama
		<i>Brycon alburnus</i>	Dama blanca
CHARACIFORMES	Bryconidae	<i>Brycon atrocaudatus</i>	Dama montañera
		<i>Brycon dentex</i>	Sábalo
	Curimatidae	<i>Pseudocurimata boulengeri</i>	Dica
		<i>Pseudocurimata troschelii</i>	Dica
	Erythrinidae	<i>Hoplias microlepis</i>	Guanchiche
	Lebiasinidae	<i>Lebiasina bimaculata</i>	Huaija
	Parodontidae	<i>Saccodon terminalis</i>	Cometero
	Heptapteridae	<i>Rhamdia quelen</i>	Barbudo
		<i>Pimelodelia modestus</i>	Chillo
	Cetopsidae	<i>Paracetopsis bleekeri</i>	Bagre ciego
SILURIFORMES	Trichomycteridae	<i>Ituglanis laticeps</i>	Madre barbudo
		<i>Isorineloricaria spinosissima</i>	Raspabalsa
	Loricariidae	<i>Hemiancistrus hammariundi</i>	Raspabalsa
		<i>Chaetostoma fischeri</i>	Guaña
	Pseudopimelodidae	<i>Microglanis variegatus</i>	Bagrecito
	Cichlidae	<i>Andinoacara rivulatus</i>	Vieja azul
		<i>Cichlasoma festae</i>	Vieja roja
		<i>Oreochromis spp.</i>	Tilapia
	Eleotridae	<i>Dormitator latifrons</i>	Chame
PERCIFORMES		<i>Eleotris picta</i>	Guabina manchada
		<i>Gobiomorus maculatus</i>	Guabina
	Gobiidae	<i>Awaous trasandeanus</i>	Lameplato
	Haemulidae	<i>Pomadasys bayanus</i>	Roncador
	Mugilidae	<i>Mugil cephalus</i>	Lisa

**Fuente:** (Revelo & Laaz, 2012)

### 3.2.2 Materiales de Laboratorio

Tubos eppendorf de 1 ml, tubos falcon de 15 ml y 50 ml, puntas de pipeta de 1000  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, pipetas de precisión de 10  $\mu$ L a 1000  $\mu$ L, cámara de neubauer, mechero, cajas petri, jeringas de 3 ml y 5 ml, probetas, vasos de precipitación, placa de Elisa.

### 3.2.3 Equipos y programas

Microscopio óptico, cámara de flujo laminar, balanza electrónica (M-220D), centrífuga MX 8624, Vórtex, pH-metro HANNA, refrigerador, computador, cámara Digital 2.0mpx Motic, programa Motic Images Plus 2.0. Mezclador Incubador Elisa STAT FAX 220, Lector de Elisa BIOTEK.

### 3.2.4 Reactivos

Agua destilada, etanol absoluto, alcohol al 70%, hidróxido de amonio, eugenol, formalina al 10 %, heparina sódica, suero fisiológico, cetona, sal en grano, ácidos orgánicos, verde malaquita, bacterias nitrificantes POND PLUS, GnRH-Ovaprim, Cayman Practice ELISA Kit de Estradiol, Cayman Practice ELISA Kit de 11keto-testosterona.

## 3.3 Métodos

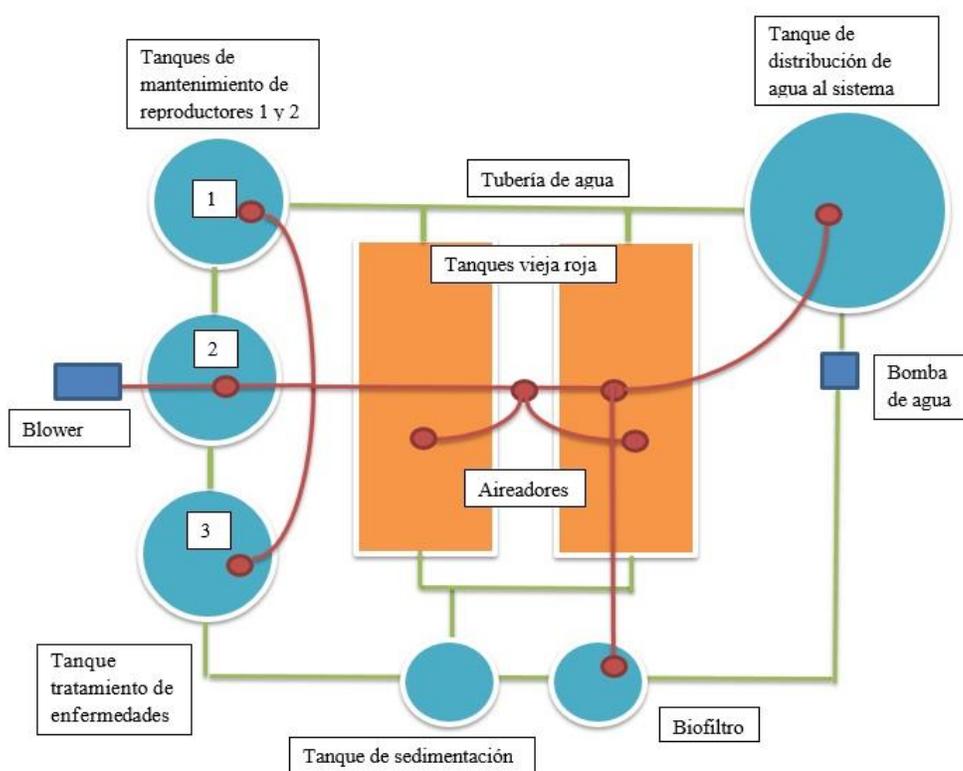
El experimento se lo realizo en el campo y en laboratorio:

**-Fase en el campo:** Se inoculó dosis de 1200 UI/kg según lo descrito por (Arias; Hernández, 2009) en las unidades experimentales en estudio. Durante el mantenimiento de los peces; se evaluaron parámetros morfométricos y productivos como: ganancia de peso (gramos), conversión alimenticia (IC), eficiencia alimenticia (EF), y parámetros ambientales como la fluctuación de temperatura ambiental ( $^{\circ}$ C) en el invernadero, temperatura del agua ( $^{\circ}$ C), oxígeno disponible en el agua (ppm), pH, y nitrógeno total( $\text{NH}_3\text{-NH}_4$ ), así como análisis para microbiología del agua.

**-Fase de laboratorio:** Se realizó los análisis de inmuno-detección aplicando la técnica ELISA directo/indirecto y acorde al origen de las muestras: Estradiol para hembras y 11 ketotestosterona para machos. Además se evaluó los tratamientos para los siguientes parámetros: análisis de calidad de agua (Microbiología), procesos de nitrificación, histología de tejidos gonadales y obtención de parámetros productivos como: índice gonadosomático (%), fecundidad absoluta y relativa

### 3.3.1 Instalación del Sistema de Recirculación de Agua

El esquema del sistema de recirculación para la adaptación de peces tropicales *Cichlasoma festae* se presenta de la siguiente manera:



**Figura 25.** Esquema del sistema de adaptación de peces tropicales en la hacienda El Prado IASA I

El sistema de recirculación se instaló en el invernadero inteligente perteneciente a la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA 1 y consta de los siguientes componentes:

- Tres tanques de 0,5 m<sup>3</sup> que fueron utilizados para la adaptación de peces y control sanitario.
- Dos tanques de 4 m<sup>3</sup> de capacidad de fibra de vidrio, en donde se alojaron las parejas de vieja roja, durante los períodos de maduración gonadal e inducción reproductiva.
- Dos tolvas cónicas de 80 litros de capacidad para procesos de depuración y nitrificación del sistema.
- Un tanque reservorio de 2 m<sup>3</sup> de capacidad para permitir la distribución de agua en todo el sistema, con una renovación de al menos el 40 % del volumen total del sistema por día.

Es importante añadir que los tanques con las especies tuvieron una aireación constante y mantuvieron una temperatura promedio de 24 °C para la adaptación de peces.

### **3.3.2 Maduración del Filtro Biológico en el sistema RAS**

El proceso de nitrificación en un sistema de recirculación es esencial para garantizar la supervivencia de los individuos al evitar la acumulación de amonio y nitritos que en cantidades elevadas son tóxicas para los peces. Este proceso es el método más práctico para la transformación de amonio a nitrito, y de nitrito a nitrato; se lo alcanza comúnmente mediante el uso de Biofiltros, y que se basan en la acción de bacterias nitrificantes que permiten la oxidación de amonio. Las bacterias que principalmente actúan en este proceso son: Nitrosomonas, Nitrosovibrio, Nitrosococcus, Nitrolobus y Nitrospira y oxidantes de nitrito que como Nitrobacter, Nitrococcus y Nitrospira (Fernández, 2011).

- **Componentes del Filtro Biológico en el sistema RAS.**

- Las bacterias nitrificantes (Biofiltro)
- Medio para la proliferación de las bacterias nitrificantes

La maduración del sistema de nitrificación se realizó en tanques de 20 litros mediante la inoculación de 0,010 Kg de bacterias nitrificantes del género Bacillus y 10 ml de Hidróxido de amonio. Una vez realizado esto se procedió a colocar tapas para la proliferación bacteriana, se realizó un análisis cada 5 días sobre la cantidad de amonio, nitrito, nitrato para conocer el estado de maduración del sistema. Con esta información se procedió a añadir un determinado volumen (mL) de hidróxido de amonio o gramos de bacterias nitrificantes de acuerdo al nivel de estos compuestos en las mediciones. La maduración de las bacterias nitrificantes en tanque de 20 L, tomó un tiempo de 35 días, posterior a ello se procedió a llevarlas a la tolva del sistema RAS, se realizó mediciones de amonio, nitrito y nitrato cada 5 días mediante kits de lectura en un espectrofotómetro.

### **3.3.3 Transporte y adaptación de peces**

La captura de los peces se realizó con la colaboración de pescadores y productores locales de Buena Fe en el Embalse del río Baba de acuerdo al calendario lunar se programó las salidas de campo desde la hacienda El Prado. El 4 de julio del 2019, se procedió a la captura de los peces de *Cichlasoma festae*, se logró la captura de 11 machos y 9 hembras, sobreviviendo 6 machos y 6 hembras al llegar al sistema RAS para su aclimatación y adaptación.

Realizada la captura de las especies se procedió a colocar en un tanque con suministro de oxígeno para mantener el bienestar de los individuos. Una vez llegaron al invernadero se procedió a un proceso de adaptación de acuerdo a la temperatura ambiental del embalse y la

temperatura en los tanques del invernadero para evitar estrés y mortalidad. Se realizó un tratamiento en solución salina y ácidos orgánicos de allí se colocó los peces en tanques predispuestos para su adaptación, donde cada tanque contó con un sistema de aireación y termostatos para mantener el bienestar animal. Se realizó el pesaje de los individuos para la obtención de biomasa y determinar la cantidad de alimento a suministrarse por día . De igual manera se observó el comportamiento de los individuos, de acuerdo a las nuevas condiciones del sistema RAS.

#### **Adaptación a temperaturas:**

- Los peces adultos de *Cichlasoma festae* se colocaron en tanques de 40 L una vez llegaron al sistema RAS, se tomó la temperatura de estos tanques y de los tanques E1 y E2 para realizar el traslado de los peces a estos tanques para su adaptación y observación.
- De acuerdo a lo mencionado anteriormente, se colocó agua de los tanques E1 y E2 del sistema RAS a los tanques de 40 L en donde se encuentran los peces, esto se realizó cada 4 minutos para que no sea brusco el cambio de temperatura y aclimatación para evitar un shock térmico y mortalidad, posterior a ello se tomó con cuidado los individuos y se ubicó en los tanques del sistema.

#### **Tratamiento de enfermedades:**

- Se preparó recipientes con un volumen de 20 L de agua para realizar un baño individual, con diferentes soluciones.
- En el primer recipiente se preparó una solución salina de 20 g/L, se realizó el baño durante 1 a 2 minutos aproximadamente.

- En el segundo recipiente se colocó agua dulce, en el cual se realizó un baño entre 2 a 5 minutos.
- En el tercer recipiente se preparó una solución con oxalato de cobre a una concentración de 1: 15000, el baño se realizó durante 1 minuto.
- Se procedió a un lavado individual de los peces en agua dulce en un cuarto recipiente, posterior a ello se los colocó en tanques de tratamiento de enfermedades.
- Se observó su respuesta ante el tratamiento realizado.
- En los tanques de recirculación (4 m<sup>3</sup>) se procedió a subir la salinidad hasta 2 ppt y se colocó una solución de azul de metileno de 0,5 a 0,7 ppm.
- Posterior al tratamiento de los tanques de recirculación se colocó los peces tratados y se realizó un monitoreo para ver su adaptación.

### **3.3.4 Inoculación de GnRH y extracción de sangre, gónadas, cerebro e hipófisis**

Posterior a la adaptación (15 días aprox), se realizó la inoculación de 1200 UI/Kg de GnRH a tres parejas de peces adultos y al mismo volumen se inoculó suero fisiológico al grupo control. La inyección se lo realizó en zona ventral bajo la aleta pectoral. Una vez realizada la inoculación se procedió a tomar las muestras correspondientes cada 7 días tanto de sangre como gónadas, con un total de 28 días desde el momento de la inoculación.



**Figura 26.** GnRH a de salmón para la inoculación a *Cichlasoma festae*.



**Figura 27.** Inoculación de GnRH (a) y suero fisiológico por vía intramuscular a *Cichlasoma festae*

**Tabla 2***Datos del pesaje y dosificación de los tratamientos en Cichlasoma festae*

<b>GnRH</b>			
<b>Nombre</b>	<b>Peces</b>	<b>Masa corporal(g)/longitud (cm)</b>	<b>Dosificación (uL)</b>
Pareja 1	Hembra	256	127
	Macho	436	217
Pareja 2	Hembra	197	98
	Macho	119	51
Pareja 3	Hembra	150	75
	Macho	156	77
Promedio		219	
<b>Suero fisiológico</b>			
Pareja 4	Hembra	215	106
	Macho	402	200
Pareja 5	Hembra	169	83
	Macho	139	68
Pareja 6	Hembra	188	92
	Macho	265	131
Promedio		229,67	

Para la extracción de muestras (sangre y gónadas) se procedió anestesiar los peces en un tanque de 30 litros a una concentración de eugenol de 3 a 10 ppt. Previa heparinización del material y mediante técnicas convencionales de extracción de sangre se obtuvieron las muestras pertinentes, siempre guardando la cadena de frío < 4°C. Para la obtención del plasma sanguíneo se utilizó una centrífuga refrigerada a 5000 rpm durante 5 minutos. Los plasmas procesados se mantuvo en volúmenes constantes entre 60 a 80 µL /pez.

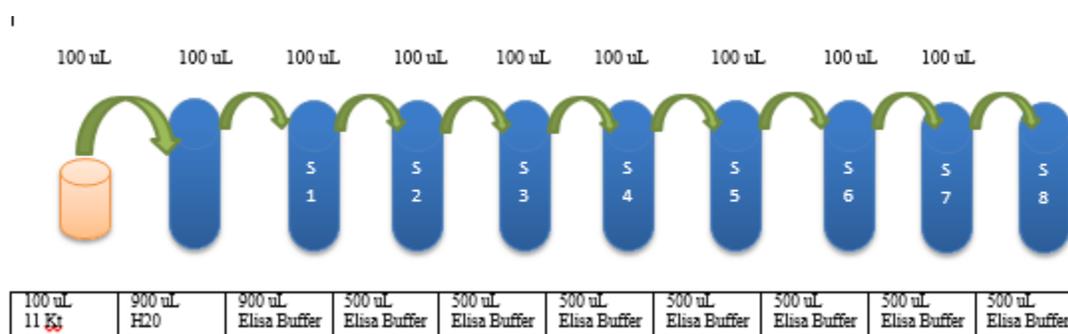
Una vez procesados los peces para muestras de sangre, se procedió a realizar la extracción de gónadas (ovarios y testículos). Se utilizaron técnicas convencionales de histología clásica con el uso de formalina al 10% para la fijación del tejido y conservación. Además se realizó la extracción de cerebro e hipófisis, y se colocó en tubos eppendorf con acetona para su conservación y deshidratación.

### 3.3.5 Determinación de las concentraciones de Estradiol y 11-Ketotestosterona mediante Elisa.

Se realizó extracciones de sangre de acuerdo a la distribución de los tratamientos del experimento, para el presente estudio se determinó 6 parejas de vieja roja *Cichlasoma festae*, 3 parejas se trabajó bajo un tratamiento de 1200 UI/Kg de GnRH (a). Hay 3 parejas con un volumen similar de 1200 UI/Kg de Suero fisiológico (0,9%). Se realizó la extracción de sangre de la vena aorta caudal por punción, se obtuvo un volumen de sangre de 0,3-0,4 mL por individuo, el cual se colocó en tubos eppendorf de 2 mL, se guardó en un cooler con hielo para evitar la degradación, terminadas las extracciones se llevó las muestras al laboratorio y se obtuvo el plasma con una centrifuga a 5000 rpm durante 10 minutos, se colocó el plasma en tubos eppendorf debidamente etiquetados y se guardó en congelador a -20° C para su conservación y evitar degradación de las muestras.

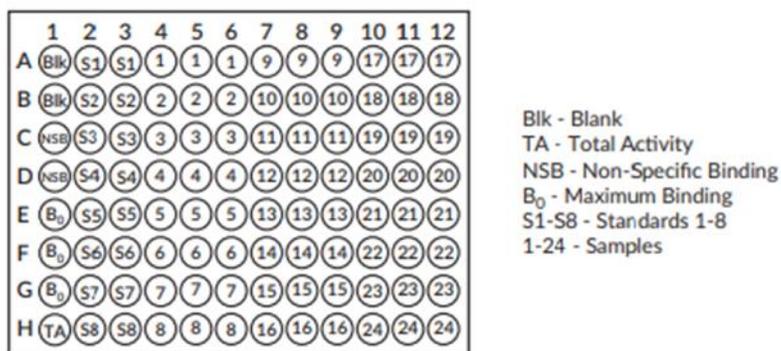
#### - Preparación Del Cayman Practice Elisa Kit De 11 Keto-Testosterona

- Preparación de estándares: Se colocó en un tubo eppendorf 900 uL de EIA Buffer + 100 uL de 11-ketotestosterona.



**Figura 28.**Preparación de estándares-Elisa

- Preparación de muestras de plasma de los machos de vieja roja *Cichlasoma festae*, se realizó una dilución de 1:5. Es decir 20 mL de plasma con 80 mL de EIA Buffer para completar una solución de 100 mL.
- Adición del tracer, se realizó la reconstitución del ACH tracer de 100 dtn 11-ketotestosterona con 6 mL de EIA Buffer
- Se realizó la reconstitución del 11-ketotestosterona ELISA Antiserum con 6 mL de EIA Buffer.
- Se realizó la adición de 100 µL ELISA Buffer a las celdas NSB y 50 µL de Elisa Buffer a las celdas Bo.
- Se añadió 50 µL de los estándares, de acuerdo a la distribución en la placa de muestras
- Se añadió 50 µL de cada muestra diluida en todas las celdas de la placa a utilizarse.
- Se añadió 50 µL del tracer a cada celda, excepto en el TA y en los blancos (Blk)
- Se incluyó el antiserum en un volumen de 50 µL en todas las celdas a excepción del TA, NSB y en los blancos.



**Figura 29.** Formato de la placa de muestras

Fuente: (FAO, 2018)

- Incubación durante 1 hora sin movimiento
- Preparación de Wash Buffer:

24 pocillos x 350 uL (Capacidad micropipeta) x 4

(lavados)=33600 uL ~ 40000 uL=40 ml H2O Destilada autoclavada

$$\frac{40000 \text{ ul}}{400 \text{ (Concentración de Wash buffer)}} = 100 \text{ uL Wash Buffer}$$

40000 H2O Destilada autoclavada- 100 uL Wash Buffer

=39900 H2O destilada autoclavada

- Adición de Polisorbato:

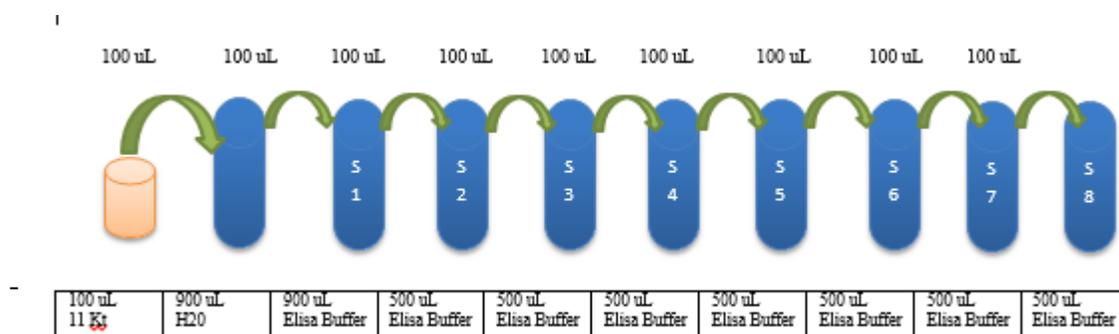
$$x = \frac{2000 \text{ uL}}{40 \text{ uL}} = 20 \text{ uL}$$

- Se procedió a dejar durante 18 horas a 4° C para su incubación y desarrollo,
- Después de la incubación se procedió al lavado de los pocillos de la placa colocando 200 µL en cada uno, por lo tanto, al final se realizó entre 4-5 lavados.
- La adición de Ellman's Reagent se lo realizó posterior al lavado, en donde se coloca 200 µL de este reactivo en cada pocillo.
- Se añadió 5 µL del tracer reconstituyendo a las celdas TA.
- Incubación se la realiza durante 60 y 90 minutos en orbital shaker.
- Una vez finalizado ese tiempo se realiza la lectura en el Lector de Elisa BIOTEK., mediante la detección de absorbancia, una fuente de luz ilumina la muestra con una longitud de onda entre 400 y 450 nm y un detector de luz situado en el otro lado del pozo mide qué porcentaje de la luz inicial (100%) se transmite a través de la muestra: la

cantidad de luz transmitida estará relacionada con la concentración de la molécula que se esté realizando el estudio.

#### - Preparación Del Cayman Practice Elisa Kit De Estradiol

- Preparación de estándares: Se colocó en tubos eppendorf 20  $\mu\text{L}$  de Estradiol con 1000  $\mu\text{L}$  EIA Buffer.



**Figura 30.**Preparación de estándares-Elisa

- Preparación de muestras de plasma de hembras de vieja roja *Cichlasoma festae*, se realizó una dilución de 1:5. Es decir 20 mL de plasma con 80 mL de EIA Buffer para completar una solución de 100 mL.
- Adición del tracer, se realizó mediante la reconstitución del ACH tracer de 100 dtn Estradiol con 6 mL de EIA Buffer.
- Se realizó la reconstitución del 11-ketotestosterona ELISA Antiserum con 6 mL de EIA Buffer.
- Se realizó la adición de 100  $\mu\text{L}$  ELISA Buffer a las celdas NSB y 50  $\mu\text{L}$  de Elisa Buffer a las celdas Bo.
- Se añadió 50  $\mu\text{L}$  de los estándares, de acuerdo a la distribución en la placa de muestras

- Se añadió 50 µL de cada muestra diluida en todas las celdas de la placa a utilizarse.
- Se añadió 50 µL del tracer a cada celda, excepto en el TA y en los blancos (Blk)
- Se incluyó el antiserum en un volumen de 50 µL en todas las celdas a excepción del TA, NSB y en los blancos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	S1	S1	1	1	1	9	9	9	17	17	17
B	Blk	S2	S2	2	2	2	10	10	10	18	18	18
C	NSB	S3	S3	3	3	3	11	11	11	19	19	19
D	NSB	S4	S4	4	4	4	12	12	12	20	20	20
E	B <sub>0</sub>	S5	S5	5	5	5	13	13	13	21	21	21
F	B <sub>0</sub>	S6	S6	6	6	6	14	14	14	22	22	22
G	B <sub>0</sub>	S7	S7	7	7	7	15	15	15	23	23	23
H	TA	S8	S8	8	8	8	16	16	16	24	24	24

Blk - Blank  
 TA - Total Activity  
 NSB - Non-Specific Binding  
 B<sub>0</sub> - Maximum Binding  
 S1-S8 - Standards 1-8  
 1-24 - Samples

**Figura 31.** Formato de la placa de muestras

Fuente: (FAO, 2018)

- Incubación durante 1 hora en agitación
- Preparación de Wash Buffer:

$$24 \text{ pocillos} \times 350 \text{ uL (Capacidad micropipeta)} \times 4$$

$$(\text{lavados}) = 33600 \text{ uL} \sim 40000 \text{ uL} = 40 \text{ ml H}_2\text{O Destilada autoclavada}$$

$$\frac{40000 \text{ ul}}{400 \text{ (Concentración de Wash buffer)}} = 100 \text{ uL Wash Buffer}$$

$$40000 \text{ H}_2\text{O Destilada autoclavada} - 100 \text{ uL Wash Buffer}$$

$$= 39900 \text{ H}_2\text{O destilada autoclavada}$$

- Adición de Polisorbato:

$$x = \frac{2000 \text{ uL}}{40 \text{ uL}} = 20 \text{ uL}$$

- Se realiza el lavado de los pocillos colocando 200 µL en cada uno, por lo tanto, al final se realizó entre 4-5 lavados.

- Adición de Ellman's Reagent se lo realizó posterior al lavado, en donde se coloca 200  $\mu$ L de este reactivo en cada pocillo.
- Se añadió 5  $\mu$ L del tracer reconstituyendo a las celdas TA.
- Incubación se la realiza durante 60 y 90 minutos en orbital shaker.
- Se realizó la lectura en el Lector de Elisa BIOTEK., mediante la detección de absorbancia, una fuente de luz ilumina la muestra con una longitud de onda entre 400 y 450 nm y un detector de luz situado en el otro lado del pozo mide qué porcentaje de la luz inicial (100%) se transmite a través de la muestra: la cantidad de luz transmitida estará relacionada con la concentración de la molécula que se esté realizando el estudio.

### **3.3.6 Análisis de calidad de Agua y curva de Nitrificación**

Una vez instalado el sistema RAS con todas las condiciones y con el sistema de nitrificación funcionando adecuadamente, cada 20 días se realizó medios de cultivo de agar MacConkey (MK), Chapman, Cetrimida, Eosina azul de metileno (EMB) para determinar la presencia y cantidad de bacterias gram- y gram+, de esta manera analizando la calidad de agua presente en el sistema y que esté dentro de los parámetros permitidos adecuados para el bienestar de los peces. También se realizó la medición de nitritos, nitratos y amonio cada 5 días. Durante el tiempo de duración del experimento para determinar que los valores encontrados estén dentro de los rangos permisibles o fracciones tóxicas establecidos mediante los protocolos de los kits y evitar mortalidad dentro del sistema.

### **3.3.7 Variables del estudio**

Las variables analizadas fueron:

### 3.3.7.1 Variables productivas

#### 3.3.7.1.1 Parámetros formométricos

La adaptabilidad de *Cichlasoma festae* se evaluó mediante las variables: ganancia de peso, conversión alimenticia y eficiencia alimenticia, para ello se suministró una dieta balanceada de tilapia y trucha arcoíris a la vez de *Artemia salina*, de acuerdo a las necesidades nutricionales de la especie al tener un régimen alimenticio carnívoro, se tomó los datos de masa corporal cada 7 días para obtener las variables productivas mencionadas.

#### Ganancia de Peso:

$$GP = \frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{\text{tiempo 2} - \text{tiempo 1}}$$

#### Conversión alimenticia:

$$IC = \frac{\text{Total del alimento ingerido (gr)}}{\text{Peso ganado (gr)}}$$

#### Eficiencia alimenticia:

$$EF = \frac{\text{Peso ganado (gr)}}{\text{Total del alimento ingerido (gr)}} * 100$$

#### 3.3.7.1.2 Concentraciones de estradiol para hembras y 11ketotestosterona para machos de *Cichlasoma festae*.

Mediante la prueba de Elisa usando los kits respectivos. Este método se usa con la finalidad de determinar las hormonas anteriormente mencionadas, consiste en una técnica de inmuno-ensayo en la cual el antígeno detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima. Donde la detección se realizará mediante espectrofotometría en un rango de 402-450 nm.

La prueba de Elisa para Estradiol está basada sobre la competición entre el estradiol nativo y el estradiol acetilcolinesterasa (AChE) conjugado (Estradiol AChE Tracer) por una cantidad limitada del antiserum de Estradiol.

### 3.3.7.1.3 Histología de tejidos gonadales de *Cichlasoma festae*

Se observó el estado de desarrollo y estructuras para la determinación de si es una especie sincrónica o asincrónica, en donde se medirán un promedio de 30 estructuras por corte histológico para obtener su longitud, ancho y estado en el que se encuentra. A su vez se obtendrá el índice gonadosomático, la fecundidad absoluta, fecundidad relativa y la cantidad de ovocitos por kg de peso; donde se realizarán con las siguientes fórmulas:

#### Índice gonadosomático:

$$\text{IGS} = \frac{\text{Peso ovarios (gr)}}{\text{Peso hembra (gr)} - \text{peso ovarios (gr)}} * 100$$

#### Fecundidad Absoluta:

$$\text{Fa} = \text{número total de ovocitos en los ovarios}$$

#### Fecundidad relativa:

$$\text{Fr} = \frac{\text{Número de ovocitos}}{\text{Peso total (gr)}}$$

### 3.3.7.2 Parámetros medioambientales

#### 3.3.7.2.1 Adaptación de peces adultos *Cichlasoma festae*

Se lo realizó en condiciones controladas las cuales se midieron mediante la utilización de un oxímetro y un pH-metro cada 2 horas para realizar curvas de fluctuación de la temperatura ambiental (°C), temperatura en el agua (°C), oxígeno disponible en el agua (ppm o mg/L) y pH.

### **3.3.7.2.2 Curva de nitrificación**

Se realizó mediciones de amonio, nitrito y nitrato cada 5 días mediante uso del espectrofotómetro y Kits de Palintest para los compuestos mencionados. También se realizó medios de cultivo selectivos cada 20 días para observar el tipo de bacterias gram- y gram+ presentes en el sistema y verificar que se encuentran en condiciones óptimas. El fundamento del espectrofotómetro es la medición de la intensidad del color, la luz pasa a través de un tubo de ensayo que contiene la solución de muestra, y luego a través de un filtro de color en un fotodetector. Los filtros de luz seleccionan la longitud de onda específica para la solución a medirse. Cuando la solución es completamente incolora toda la luz pasa a través de la muestra. Con muestras de colores, la luz es absorbida y lo que pasa a través de la muestra se reduce proporcionalmente. Los kits de nitritos, nitratos y amonio reaccionan con el agua de muestra, la intensidad del color producida es proporcional a la concentración del parámetro a medirse de acuerdo a la longitud de onda para los parámetros. El espectrofotómetro está programado con calibraciones para cada parámetro de prueba (URS, 2006).

### **3.3.8 Diseño Experimental**

#### **3.3.8.1 Factores**

En la fase experimental se evaluaron 1200 UI/Kg de peso de GnRH y 1200 UI/Kg de peso de suero fisiológico (Testigo).

#### **3.3.8.2 Tratamientos**

En la fase experimental se evaluó 2 tratamientos con 3 repeticiones por cada tratamiento, la aplicación de GnRH (1200 UI/Kg) y Suero Fisiológico/testigo (1200 UI/Kg) sobre cada unidad experimental.

**Tabla 3***Tratamientos aplicados a Cichlasoma festae*

Tratamiento	Códigos	Concentración (UI/Kg)
T0.1	SF1H1- SF1M1	1200
T0.2	SF1H2- SF1M2	1200
T0.3	SF1H3- SF1M3	1200
T01.1	G1H1- G1M1	1200
T01.2	G1H2- G1M2	1200
T01.3	G1H3- G1M3	1200

**3.3.8.3 Tipo de diseño**

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con 3 repeticiones tomando en cuenta que las condiciones de los tanques son homogéneas.

**3.3.8.4 Características de las unidades experimentales**

El estudio constó de 6 unidades experimentales, donde la unidad experimental es una pareja; da un total de 12 individuos. Los individuos presentan un rango de peso de entre 150 a 250 gramos.

**3.3.8.5 Croquis del diseño experimental**

El estudio presentó el siguiente croquis experimental el cual se realizó con una distribución aleatoria de los tratamientos (Figura 32).

T0.3	T1.2
T1.1	T0.2
T1.3	T0.1

**Figura 32.** Croquis experimental**3.3.8.6 Modelo matemático**

En el experimento se utilizó el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + D_i + e_{ij}$$

Dónde:

$\mu$  =Media poblacional

$D_i$ =Efecto del i-ésima Dosis

$e_{ij}$ =Error experimental

### **3.3.9 Análisis estadístico**

El análisis de datos obtenidos en el estudio se realizó mediante el software estadístico Infostat.

### **3.3.10 Análisis funcional**

Las variables evaluadas en el experimento se calcularon mediante estadística descriptiva empleando las medidas de resumen (media, desviación estándar y coeficiente de variación), graficas (en barras y de dispersión). En la variable de concentración de estradiol y 11 ketotestosterona se empleó ANOVA (análisis de varianza) aplicado para observar si se encuentran diferencias significativas entre tratamientos. Se realizó la prueba de Shapiro wilks para determinar la normalidad y la prueba de Levene para comprobar la homocedasticidad de los datos.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Evaluación de los parámetros ambientales del sistema RAS

Los factores tanto abióticos como bióticos en conjunto logran un equilibrio adecuado para el desarrollo correcto del cultivo, ya que depende de estas variables que son físicas, químicas y biológicas las cuales se deben manejar en el sistema de recirculación para un exitoso manejo del mismo.

El comportamiento de las variables físicas, químicas y biológicas se las demuestra en las siguientes gráficas y tablas.

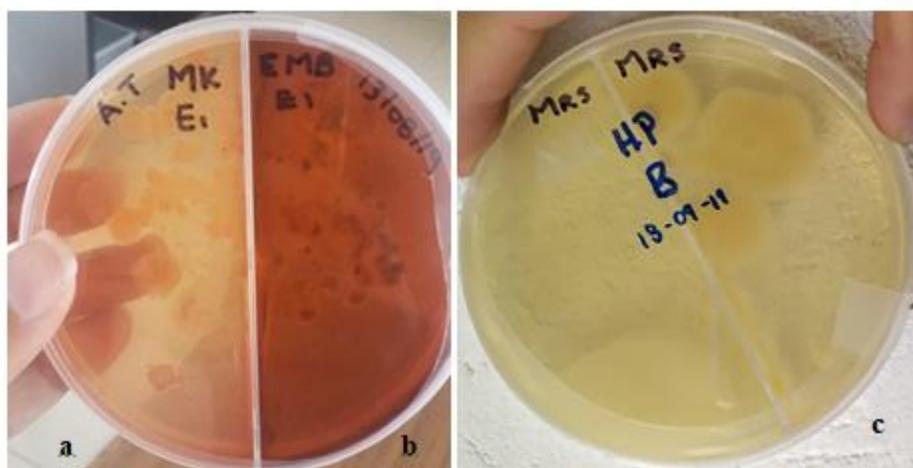
- Temperatura
- pH
- Oxígeno
- NH<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub>

##### 4.1.1 Evaluación de Bacterias presentes en el sistema

Como parte del análisis microbiológico se realizó la identificación bacteriana y se determinó la predominancia bacteriana de las siguientes familias durante la fase de experimentación en el campo que son *Proteus* (colonia incolora, lactosa-), *Enterobacter* (colonia negro azulado) y *Bacillus* (colonia incolora, catalasa+); como se observa en la Figura 33.

**Tabla 4**  
*Predominancia bacteriana en el sistema de recirculación*

Bacterias	Medios				
	MacConkey	EMB	Chapman	Cetrimida	MRS
<i>Proteus sp.</i>		X			
<i>Enterobacter sp.</i>	X		X		
<i>Escherichia coli</i>					
<i>Staphylococcus sp.</i>					
<i>Bacillus sp.</i>					X



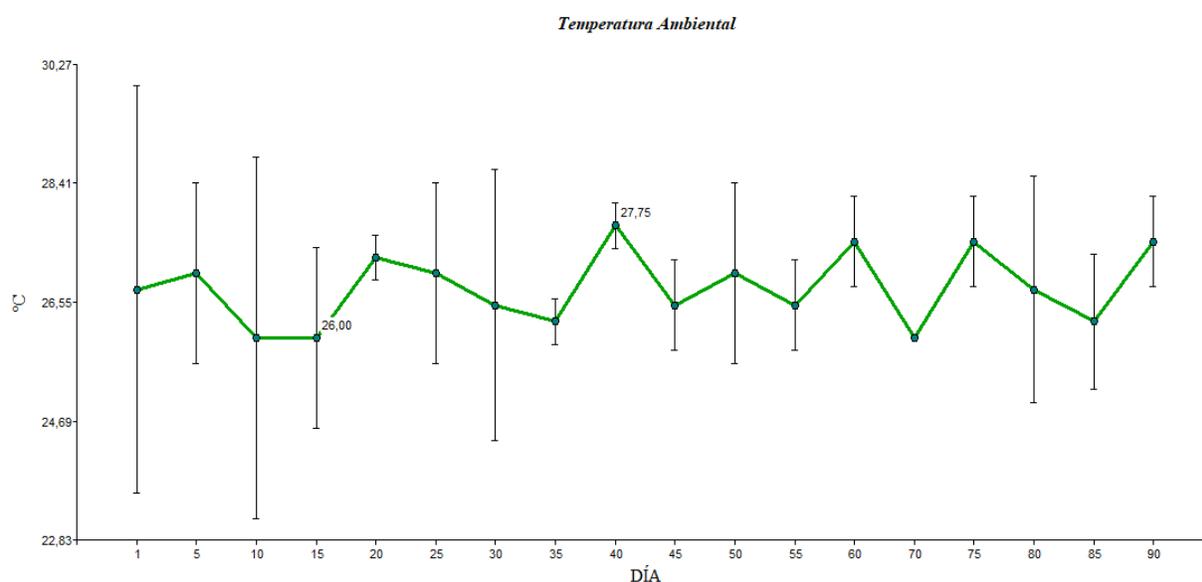
**Figura 33.** Bacterias presentes en el sistema de recirculación (RAS).  
 a) *Enterobacter sp.*, b) *Proteus sp.*, c) *Bacillus sp.*

Según Wold et al. (2014), determinaron que en el sistema de recirculación (RAS) se desarrolla y mantiene una comunidad microbiana más diversa y estable en comparación con el flujo tradicional, esto concuerda con las bacterias encontradas en nuestro estudio ya que tanto la cantidad de *Proteus sp.* como *Enterobacter sp.*, se halló en cantidades mínimas, y tomando también en consideración que estos dos tipos de bacterias son negativas a la lactasa lo que demuestra que son no fermentadoras. A su vez también se encontró *Bacillus sp.* en los tres meses

del experimento, deduciendo que permitía la continua transformación de los compuestos nitrogenados  $\text{NH}_4$  y  $\text{NO}_2$  (Tabla 4).

#### 4.1.2 Evaluación de la Temperatura

La temperatura ambiental dentro del Invernadero Inteligente del IASA, presentó variaciones entre los picos mínimos y máximos, siendo la mínima general de  $16^\circ\text{C}$  y la máxima general de  $40^\circ\text{C}$ , desde el 03 de Julio hasta el 03 de octubre del 2019 de evaluación del experimento, mientras la temperatura promedio general fue de  $26,99^\circ\text{C} \pm 1,09$  (Figura34).

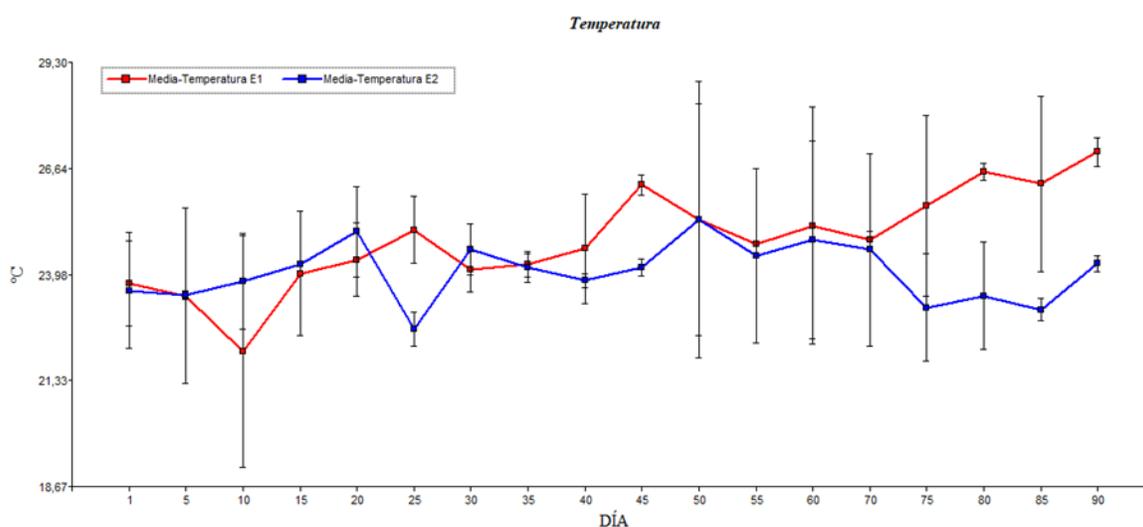


**Figura 34.** Temperatura ambiental del Invernadero del IASA I

Según Sangucho (2015), la temperatura promedio ambiente dentro del invernadero en el año 2015 durante el periodo de Julio a Octubre fue de  $26,2^\circ\text{C} \pm 1,42$ , como la temperatura mínima de  $20^\circ\text{C}$  y la temperatura máxima de  $38^\circ\text{C}$ . A su vez también Andrade (2018), presenta una temperatura máxima de  $42^\circ\text{C}$ , temperatura media de  $28^\circ\text{C} \pm 1,2$  y una temperatura mínima de  $24^\circ\text{C}$  durante el año 2018 en la época de Agosto a Diciembre; lo cual es similar al presente

estudio ya que se observó que en la época de Julio a Octubre en el año 2019 se encontró una temperatura mínima general de 16° C y la máxima general de 40° C, desde el 03 de Julio hasta el 03 de octubre del 2019 de evaluación del experimento, mientras la temperatura promedio general fue de 26,99 °C  $\pm$  1,09.

La temperatura del agua del tanque E1 en el sistema RAS, presentó variaciones entre los picos mínimos y máximos, siendo la mínima general de 20°C y la máxima general de 26,7°C, durante los días de evaluación del experimento, mientras la temperatura promedio general fue de 24,35°C  $\pm$  1,02(Figura19). La temperatura del agua del tanque E2 en el sistema RAS, presentó variaciones entre los picos mínimos y máximos, siendo la mínima general de 20,5° C y la máxima general de 27,9°C, durante los días de evaluación del experimento, mientras la temperatura promedio general fue de 24,09° C  $\pm$  0,97 (Figura35).



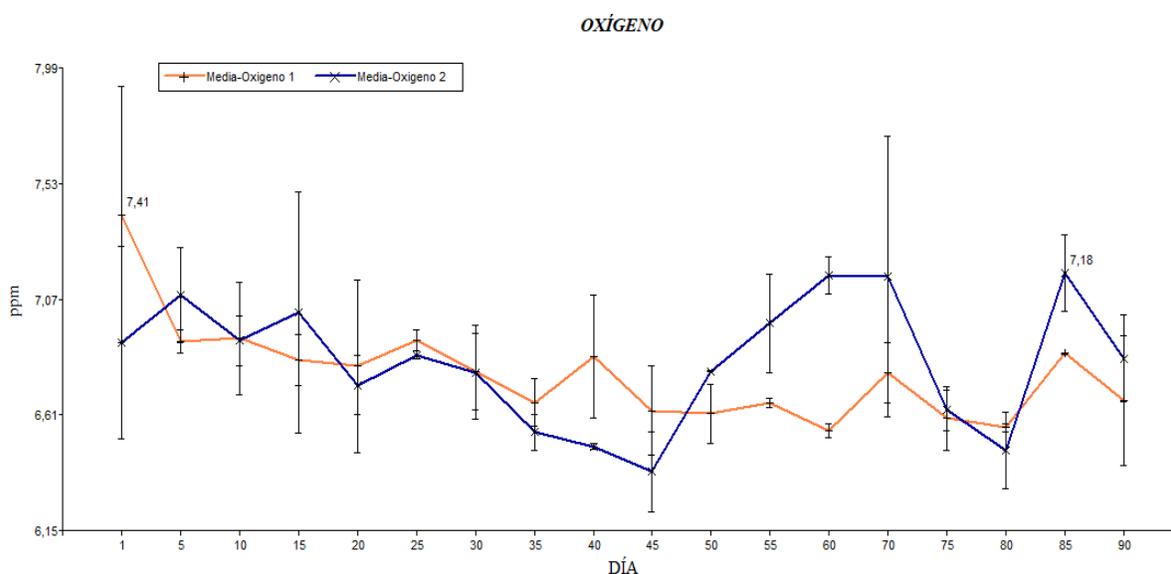
**Figura 35.** Temperatura del agua tanque E1, E2 RAS

Según Manzon, (2017) menciona que se obtuvo una adaptabilidad adecuada de *Oreochromis aureus* en un rango de temperatura de 20  $\pm$  5°C, ya que la temperatura ideal para su desarrollo

fluctúa entre 20 y 35°C, lo cual coincide con Calderón (2016), que sugiere que la temperatura óptima para un desarrollo normal se encuentra en un rango de 24 a 32°C. Paz (2019) indica que el desarrollo normal de *Cichlasoma festae* oscila entre las temperaturas de 22 y 29, mientras que la temperatura óptima de desove se encuentra entre 25 y 30°C, por lo cual se observó que la temperatura manejada en los dos tanques (E1, E2) durante la fase experimental fue la adecuada para un desarrollo óptimo de *Cichlasoma festae* ya que se manejó en un rango de 20°C a 28°C (Figura 35).

#### **4.1.3 Evaluación del Oxígeno**

El oxígeno disponible en el agua del tanque E1 en el sistema RAS, presentó variaciones entre los picos mínimos y máximos, siendo la mínima general de 5,78 mg/L O<sub>2</sub> y la máxima general de 8,61 mg/L O<sub>2</sub>, durante los días de evaluación del experimento, mientras el oxígeno disponible en promedio general fue de 6,79 mg/L O<sub>2</sub> ± 0,30 (Figura2). El oxígeno disponible en el agua del tanque E2 en el sistema RAS, presentó variaciones entre los picos mínimos y máximos, siendo la mínima general de 5,67 mg/L O<sub>2</sub> y la máxima general de 8 mg/L O<sub>2</sub>, durante los días de evaluación del experimento, mientras el oxígeno disponible en promedio general fue de 6,82 mg/L O<sub>2</sub> ± 0,29 (Figura36).



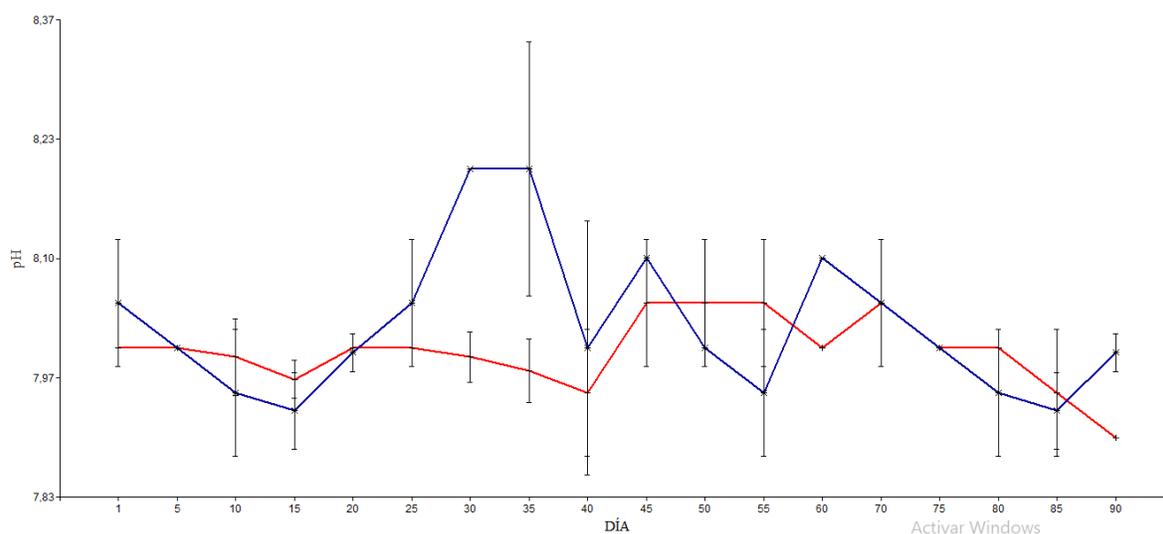
**Figura 36.** Oxígeno disponible del tanque E1 y E2 (RAS)

Seginer (2012) menciona que en el sistema de recirculación el oxígeno óptimo para el correcto desarrollo de los peces se encuentra en un rango de 5,6 a 7,8mg/l, ya que el oxígeno se encuentra relaciona con la temperatura del agua, al tener una temperatura entre 20 a 30 °C la disponibilidad de oxígeno será constante. Castillo (2011) sugiere que el rango ideal para el crecimiento de los peces en el sistema RAS se encuentra de 5 a 9 mg/l; por lo tanto en nuestro sistema el nivel de oxígeno en los dos tanques (E1, E2) se encuentra dentro de un rango de 5,78 a 8,61 mg/l con una temperatura dentro de un rango de 20 a 28 °C deduciendo que presenta optima condiciones para el desarrollo de *Cichlasoma festae* (Figura 36).

#### 4.1.4 Evaluación del potencial de hidrógeno pH

El pH en el agua del tanque E1 en el sistema RAS, el pH mínimo fue de 7,9 y el pH máximo fue de 8,1, mientras el pH en promedio fue de  $7,99 \pm 0,05$  (Figura2). Mientras el pH en el agua

del tanque E2, el pH mínimo fue de 7,9 y el pH máximo fue de 8,3, mientras el pH en promedio fue de  $8,04 \pm 0,09$  durante los días de evaluación del experimento (Figura2).

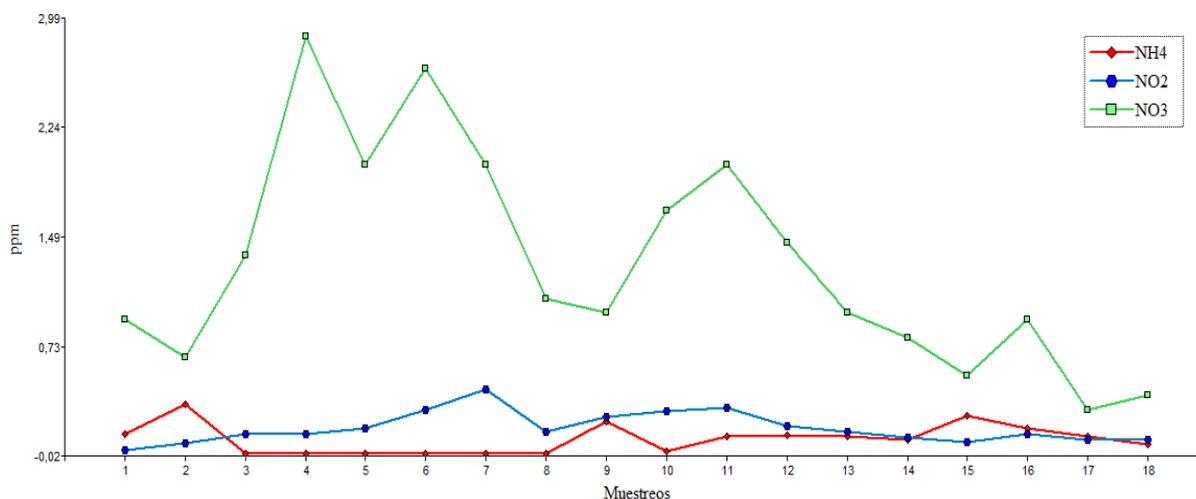


**Figura 37.** pH del tanque E1 y E2 (RAS)

Sedano, et al. (2016) dice que el pH adecuado para una buena calidad de agua se encuentra entre 5 y 9 y determina que *Oreochromis aureus* pueden tolerar un rango de pH entre 6 y 9,5. Mientras Saavedra (2016) recomienda el sistema debe presentar un pH entre 7 y 8 para un desarrollo normal de los peces. En el sistema de recirculación se obtuvo un rango de pH entre 7,9 y 8,3 que permitió obtener una buena calidad de agua (Figura 37).

#### 4.1.5 Evaluación de la Curva de Nitrificación

En la curva de nitrificación se puede determinar que la concentración de nitrato promedio  $1,30 \text{ ppm} \pm 0,74$  es superior a la de nitrito y amonio en  $1 \text{ ppm}$  aproximadamente, ya que la cantidad de nitrito promedio es de  $0,17 \text{ ppm} \pm 0,11$  y la de amonio promedio es  $0,10 \text{ ppm} \pm 0,09$ ; mientras estas dos últimas permanecen dentro de los rangos establecidos que deben de ser menor a  $0,5 \text{ ppm}$  para evitar ser toxico para los peces dentro del sistema de recirculación (RAS) (Figura38).



**Figura 38.** Comportamiento ambiental del  $\text{NH}_3+\text{NH}_4$  y su transformación en el tiempo a  $\text{NO}_2$  Y  $\text{NO}_3$  mediante procesos oxidativos y acción bacteriana *Bacillus sp.*

En el estudio se obtuvo un adecuado funcionamiento del sistema de nitrificación ya que al realizarse el análisis de amonio, nitrito y nitrato, cada 5 días se observó que las concentraciones de nitrato durante todo el experimento fue superior a 1 ppm aproximadamente a las concentraciones de nitrito promedio de  $0,17 \text{ ppm} \pm 0,11$  y la de amonio promedio es  $0,10 \text{ ppm} \pm 0,09$ ; mientras estas dos últimas permanecieron en el rango permisible que es inferior a 0,5 ppm (Fig1). Sedano, et al. (2016) mencionan que *Oreochromis aureus* presenta una tolerancia alta a la presencia de compuestos nitrogenados, llegando a soportar concentraciones de nitrato hasta 300 ppm, de nitrito y amonio hasta de 0,5 ppm. Mientras que Cao et al. (2012) indica que los valores óptimos en un sistema de recirculación se encuentra para el nitrito en  $0.47 \pm 0.29$  y de nitrato  $73.01 \pm 38.15$ . Se determinó que los valores obtenidos en el experimento están dentro de los rangos permisibles para una adaptabilidad correcta de *Cichlasoma festae*.

#### 4.1.6 Evaluación de parámetros morfométricos

Los parámetros morfométricos de *Cichlasoma festae* que ingresaron al sistema RAS para el grupo con GnRH: masa corporal promedio de 219 g  $\pm$  116,34, longitud total de 22,33 cm  $\pm$  4,08, longitud parcial de 18,08 cm  $\pm$  3,75 y ancho de 8,1 cm  $\pm$  5,2. Mientras que el grupo control fue de 229,67 g  $\pm$  94,66, longitud total de 22 cm  $\pm$  4,15, longitud parcial de 18,17 cm  $\pm$  3,92 y ancho de 7,95 cm  $\pm$  1,29 (Tabla 5).

**Tabla 5**

*Datos de parámetros morfométricos de Cichlasoma festae*

GnRH								
Nombre	Peces	Masa corporal (g)	Longitud (cm)	Total	Longitud (cm)	Parcial	Ancho (cm)	
Pareja 1	Hembra	256		23		19	8,3	
	Macho	436		30		25	11	
Pareja 2	Hembra	197		21		17	8	
	Macho	119		18		14	7	
Pareja 3	Hembra	150		21		17	7,3	
	Macho	156		21		16,5	7	
Promedio		219 $\pm$ 116,34		22,33 $\pm$ 4,08		18,08 $\pm$ 3,75	8,1 $\pm$ 1,52	
Suero fisiológico								
Pareja 4	Hembra	215		22		18	7,5	
	Macho	402		29		25	10,5	
Pareja 5	Hembra	169		20		16	7,2	
	Macho	139		17		14	7,5	
Pareja 6	Hembra	188		20		16	7	
	Macho	265		24		20	8	
Promedio		229,67 $\pm$ 94,66		22 $\pm$ 4,15		18,17 $\pm$ 3,92	7,95 $\pm$ 1,29	

Los parámetros morfométricos de los individuos del estudio, se mantuvieron en condiciones similares y se puede decir que se realizó el experimento bajo condiciones homogéneas entre todos los individuos tanto machos como hembras. El mayor peso fue de los machos bajo el efecto

de suero fisiológico con  $255 \pm 34,07$  g, mientras en el tamaño tanto de largo y ancho es de  $23,33 \pm 6,03$  cm y de  $8,67 \pm 1,61$  cm respectivamente (Tabla 6).

**Tabla 6**

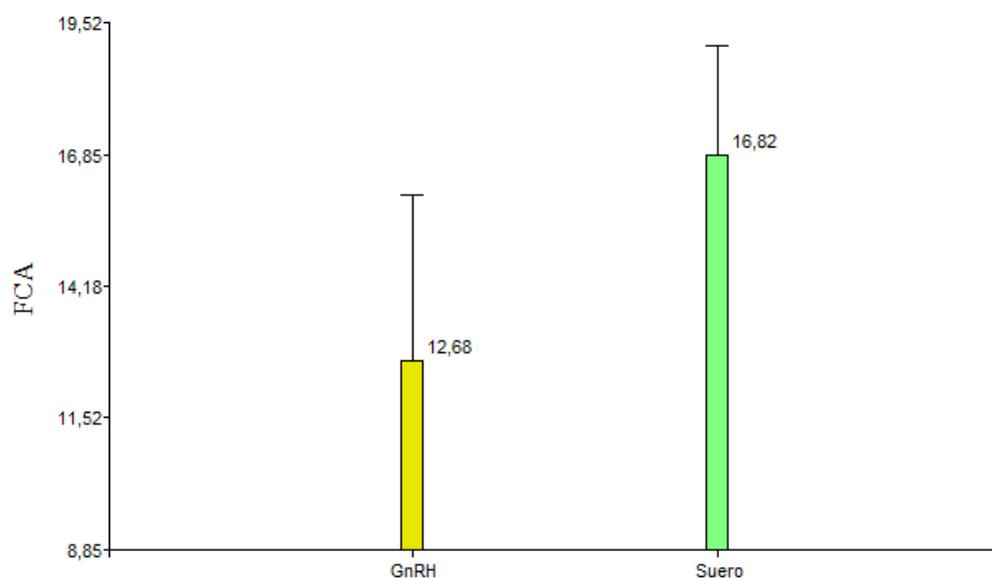
*Promedio  $\pm$  desviación estándar de los parámetros morfométricos de *Cichlasoma festae**

Tratamientos		GnRH	Suero Fisiológico
Masa (g)	Hembras	$191,33 \pm 42,42$	$188 \pm 17,75$
	Machos	$208,22 \pm 43,69$	$255 \pm 34,07$
Longitud Parcial (cm)	Hembras	$17,67 \pm 1,15$	$16,67 \pm 1,15$
	Machos	$18,5 \pm 5,77$	$19,67 \pm 5,51$
Longitud Total (cm)	Hembras	$21,67 \pm 1,15$	$20,67 \pm 1,15$
	Machos	$23 \pm 6,24$	$23,33 \pm 6,03$
Ancho (cm)	Hembras	$7,87 \pm 0,51$	$7,23 \pm 0,25$
	Machos	$8,33 \pm 2,31$	$8,67 \pm 1,61$

Una vez tomados los parámetros morfométricos iniciales de *Cichlasoma festae*, se procedió a un periodo de adaptación de los individuos al sistema RAS durante 7 días, iniciando el 2 de julio del 2019, con el ingreso de los peces al sistema, después del período de adaptación el día 9 de julio del 2019, se procedió a realizar el pesaje de los peces e implementó una dieta balanceada de acuerdo a la biomasa total existente en el sistema RAS, con alimento de trucha arcoíris, con un contenido proteico del 40-45% y una ración del 1,5% del total de la biomasa, alimento de tilapia con un contenido proteico de 22 - 25% y una ración del 1,5% del total de la biomasa, si la temperatura es de  $22^{\circ}$  C y *Artemia salina*, como alimento vivo con un contenido proteico del 52-74% y lípidos del 8-16% con una ración del 1,5% de la biomasa del sistema RAS. Posterior a ello se realizó una nueva toma de datos cada 7 días (3 muestreos) para un seguimiento de los parámetros morfométricos; masa corporal, ganancia de peso, conversión alimenticia y eficiencia alimenticia (Toledo, García, 2000; Orna, 2010; Ochoa, 1998) (Tabla 7)

**Tabla 7***Masa corporal de los peces de Cichlasoma festae durante la maduración gonadal*

Nombre	Peces	GnRH				Ganancia de peso (g)	Conversión alimenticia	Eficiencia alimenticia %
		Masa corporal inicial (g) 9/7/2019	Masa corporal 1ra extracción (g) 16/7/2019	Masa corporal 2da extracción (g) 24/7/2019	Masa corporal 3ra extracción (g) 31/7/2019			
Pareja 1	Hembra	256	257			1	26,88	3,72
	Macho	436	439			3	15,26	2,184
Pareja 2	Hembra	197	198	200		3	13,79	2,417
	Macho	119	122	125		7	3,57	4,002
Pareja 3	Hembra	150	153	154	157	7	6,75	2,116
	Macho	156	157	159	161	5	9,828	2,035
Promedio		219	221	159,5	159	4,3	12,7	2,7
<b>Suero fisiológico</b>								
Pareja 4	Hembra	215	216			1	22,575	4,43
	Macho	402	404			2	21,105	2,369
Pareja 5	Hembra	169	170	172		3	11,83	2,818
	Macho	139	141	142		3	9,73	3,426
Pareja 6	Hembra	188	189	191	192	4	14,805	1,689
	Macho	265	266	267	269	4	20,869	1,198
Promedio		229,67	231	193	230,5	4	17,8	1,4



**Figura 39.** Promedio  $\pm$  desviación estándar de la conversión alimenticia de *Cichlasoma festae*

En la presente investigación se realizó 3 muestreos en *Cichlasoma festae*, en el sistema RAS a estos individuos se dio una dieta balanceada con alimento de tilapia con un porcentaje de proteína del 32% en los que se pudo evidencia que la ganancia de peso tuvo un promedio de 4,3 g para los individuos inoculados con GnRH, la conversión alimenticia fue de 12,7 y la eficiencia alimenticia de 2,6, mientras que para los individuos inoculados con suero fisiológico fue de 4 g, durante un periodo de 28 días, la conversión alimenticia fue de 17,8 y la eficiencia alimenticia de 1,4.

De acuerdo a Zafra (2019), que evaluó la conversión y eficiencia alimenticia de *Oreochromis aureus* var suprema (Cichlidae) en un sistema RAS obtuvo una tasa de conversión alimenticia de 1,76 y la eficiencia alimenticia de 58,21%.

De acuerdo a Sánchez (2006), en su estudio “Evaluación de la ganancia de peso y conversión alimenticia de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) en la etapa de engorde 2 alimentada con

diferentes relaciones proteína: grasa” obtuvo ganancia diaria de peso de  $3,97 \pm 0,66$  g, una tasa de conversión alimenticia de  $0,0010637 \pm 0,20$  y eficiencia alimenticia del 53%.

De acuerdo a Martillo (2019), en su estudio “Evaluación de tres niveles de proteína sobre el crecimiento en juveniles de la vieja colorada (*Cichlasoma festae*)” implementó dietas balanceadas con un nivel proteico del 50% presentando una tasa de conversión alimenticia de 1,39 y un coeficiente de variación de 17,78%, además de una tasa de crecimiento específico de 19,80% , mientras que con el 32% de proteína presentó una tasa de conversión alimenticia de 1,06 y una tasa de crecimiento específico de 14,76%.

De acuerdo a Mazón, Herrera, García<sup>4</sup>, Delgado & Guzmán, (2017). En su estudio “Digestibilidad aparente de dietas con torta de palmiste sobre el rendimiento productivo de la especie nativa *Cichlasoma festae* en la etapa de cría” obtuvo una tasa de crecimiento de  $1,46 \pm 0,7$  y una tasa de conversión alimenticia de  $1,31 \pm 0,005$  con la inclusión de una dieta alimenticia con 12% de palmiste.

En el caso de *Cichlasoma festae* aún no se tiene un perfil enzimático establecido para determinar los requerimientos nutricionales idóneos de la especie debido a que el proyecto está en etapa de adaptación de la especie al cautiverio con un fin de repoblación de su zona nativa y con un fin de producción y diversificación en los criaderos piscícolas (Tabla 7).

#### **4.2 Estimación de las concentraciones de 17 $\beta$ Estradiol y 11-Ketotestosterona**

##### **- Estradiol**

La variable de dosis en concentraciones de estradiol cumplió con el supuesto de normalidad y el de homocedasticidad transformando los datos a escores normales (número de desviaciones estándar con respecto a la media) para cumplir con la verificación de ambos supuestos ( $p > 0,05$ ).

**Tabla 8***Verificación de supuestos para estradiol*

	Variable	n	W*	F-value	p-valor
Shapiro Wilks	pg/ml	12	0,85	-	0,0663
Levene	pg/ml	12		1,67	0,99

En la tabla 9 se muestra el análisis de varianza para el comportamiento del estradiol circulante en hembras adultas *Cichlasoma festae* bajo la acción de GnRH y suero fisiológico, donde no se encontró un efecto significativo de los tratamientos (F=3,39; p=0,0953) (Tabla 8).

**Tabla 9***Análisis de varianza del comportamiento del estradiol circulante en hembras adultas Cichlasoma festae, bajo la acción de los tratamientos*

Fuentes de Variación	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	F-Value	p-valor
Dosis	316316,25	1	316316,25	3,39	0,0953 ns
Error	932226,37	10	93222,64		
Total	1248542,62	11			

ns\*:no significativo

En la tabla 10 se presenta la media bajo el efecto de GnRH que fue de 124,57 pg/ml  $\pm$ 50,14, un coeficiente de variación de 40,25 %, un valor mínimo de 91,8 pg/ml y un valor máximo de 224,83 pg/ml; mientras bajo el efecto del suero fisiológico 449,28  $\pm$  428,87 un coeficiente de variación de 95,46 %, un valor mínimo de 83,65 pg/ml y un valor máximo de 1029,09 pg/mL.

**Tabla 10***Estadística descriptiva para el comportamiento del estradiol circulante en hembras adulta Cichlasoma festae, bajo la acción de los tratamientos*

Tratamiento	GnRH	Suero
N	6	6
Media	124,57	449,28
Desviación estándar	50,14	428,87
Error estándar	20,47	175,09
Coefficiente de Variación	40,25	95,46
Mínimo	91,8	83,65

**CONTINÚA** 

Máximo	224,83	1029,09
Percentil (25%)	95,76	105,98
Percentil (75%)	118,29	922,03

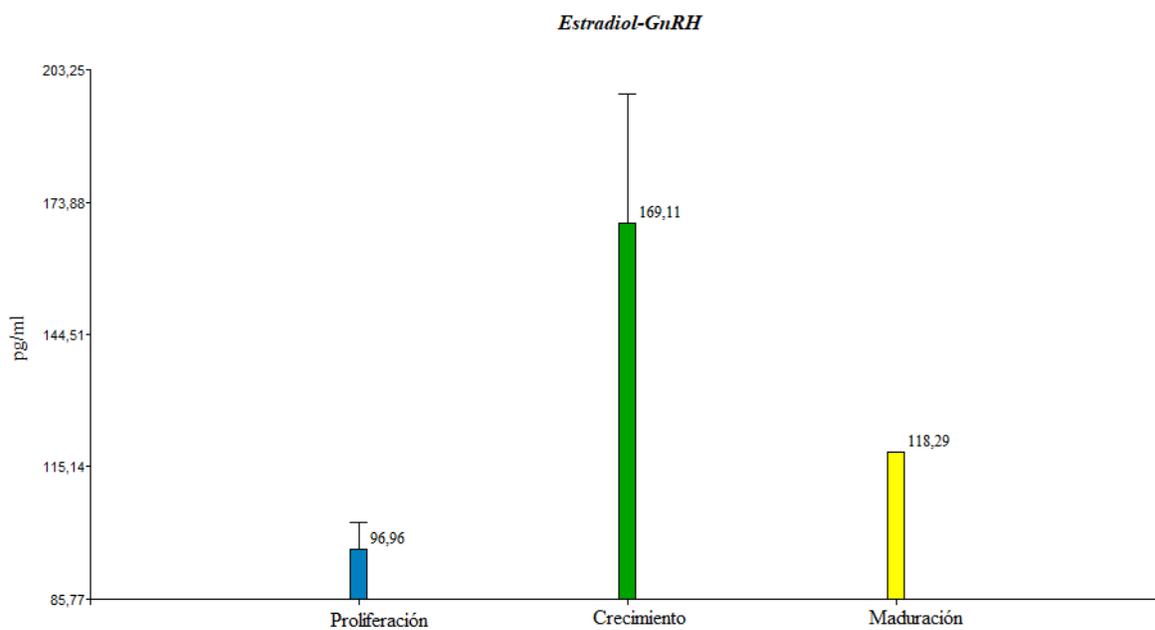
En la tabla 11 encontramos el comportamiento del estradiol, en donde el 16 de julio se realizó la primera toma de sangre, presentando una concentración promedio de 96,96 pg/ml  $\pm$  5,86, el 24 de julio se realizó el segundo muestro, presentando una concentración promedio de 196,11 pg/ml  $\pm$  78,78, se observa un incremento de la concentración del estradiol en 80 pg/ml aproximadamente y el 31 de julio se realizó el tercer muestreo, presentando una concentración promedio de 118,29 pg/ml, observándose una disminución la concentración de estradiol en unos 50 pg/ml aproximadamente entre el segundo y tercer muestreo bajo el efecto de la GnRH (Tabla 11, Figura40).

Mientras que en el primer muestreo bajo el efecto del suero fisiológico encontramos que la concentración promedio 370 pg/ml  $\pm$  477,72, en el segundo muestreo la concentración promedio fue de 277,46  $\pm$  222,26 que demuestra que en este caso la concentración disminuyo 90pg/ml aproximadamente respecto al primer muestreo y en el tercer muestreo la concentración fue de 1029,09 pg/ml aumentando así en 900 pg/ml aproximadamente con respecto al segundo muestreo (Tabla11, Figura41). Las concentraciones de estradiol bajo el efecto de suero fisiológico 449,28  $\pm$  428,87 fue mayor a la concentración bajo el efecto de la GnRH 124,57 pg/ml  $\pm$ 50,14, en 200 pg/ml promedio aproximadamente en total de los tres muestreos (Tabla 11).

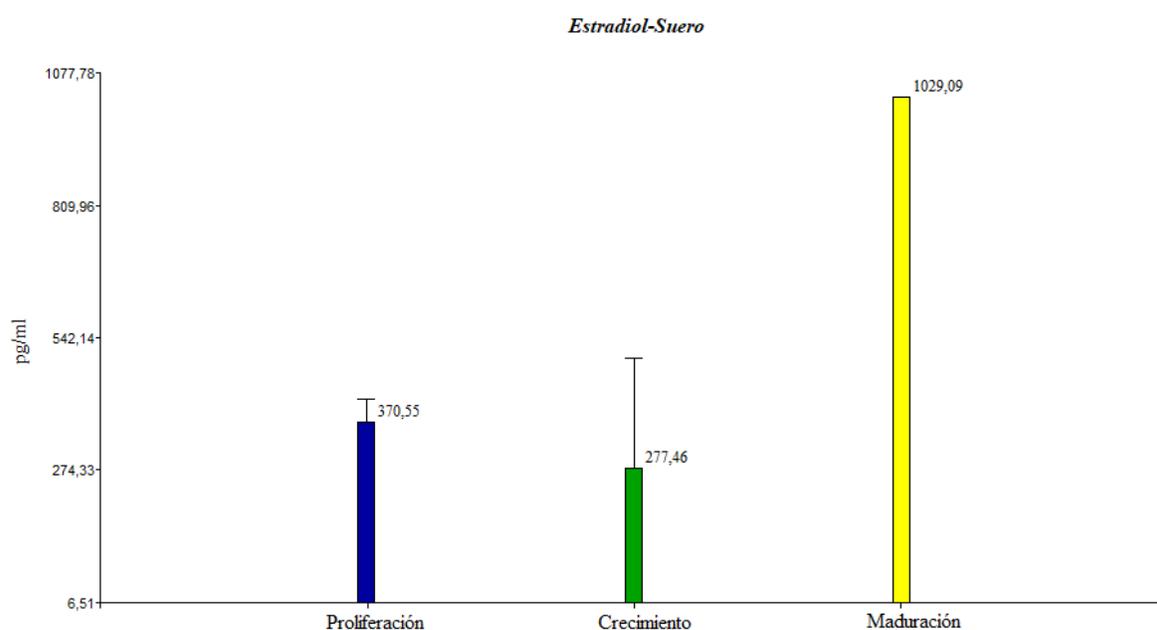
**Tabla 11**

*Estadística descriptiva de las concentraciones del estradiol circulante en hembras adultas Cichlasoma festae, bajo la acción de los tratamientos*

	<b>GnRH VR 1</b>	<b>GNRH VR 2</b>	<b>GnRH VR 3</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desvest</b>	<b>CV</b>
Toma 1	95,76	91,80	103,33	96,96	5,86	6,04
Toma 2		224,83	113,39	169,11	78,80	46,60
Toma 3			118,29	118,29		
	<b>SF VR 1.1</b>	<b>SF VR 2.1</b>	<b>SF VR 3.1</b>			
Toma 1	105,98	922,03	83,65	370,55	477,72	128,92
Toma 2		120,30	434,63	277,46	222,26	80,10
Toma 3			1.029,09	1.029,09		



**Figura 40.** Promedio  $\pm$  desviación estándar de las concentraciones de estradiol (pg/ml) bajo el efecto de la GnRH



**Figura 41.** Promedio  $\pm$  desviación estándar de las concentraciones de estradiol (pg/ml) bajo el efecto del suero fisiológico

Tacon et al (2005) menciona que el nivel plasmático de E2 bajo el efecto de GnRH permaneció en un rango 50–100 pg/ ml durante los primeros 6 días de la inoculación y posteriormente aumentó significativamente para alcanzar un pico en el día 12 aproximadamente 250pg/ ml, posteriormente a los 12 días fluctuó en un rango de 160 a220 pg/mL. Biswas et al.(2005) detecta una concentración máxima al día 12 ,durante 15 días de seguimiento ;lo cual es similar con nuestro proyecto que alcanza su pico máximo en el día 14, durante 21 días de seguimiento (Figura40).

Tacon et al (2005) determina que bajo el tratamiento control se pudo diferenciar en *Oreochromis niloticus* altos niveles de E2 durante todo el ciclo sexual, mientras que al final del ciclo, indica que existe un aumento de la concentración de E2; lo que es similar con nuestro proyecto ya que se determinó que la concentración final fue de 1029,09 pg/ml en el día 21 en

comparación con las concentraciones en el día 7 y 14 que fueron de 370,55 pg/ml y de 277,46 pg/ml respectivamente (Figura41).

Davis et al (2007) menciona que bajo el efecto de GnRH las concentraciones de E2 se mantuvieron bajas y uniformes. Este comportamiento se diferencia del control, lo que implica un cambio en la matriz biológica de *O. niloticus*. Esto se debe que en el momento de la liberación de las hormonas de forma pulsátil existe una respuesta sostenida por parte del receptor. Al contrario cuando se lo realiza de forma continua, la célula blanco se satura, los receptores cambian de señalización y se desensibilizan. Esto implica que cada célula regula su propio receptor para una respuesta dada. Esto coincide con nuestro estudio ya que las concentraciones de E2 bajo el efecto de GnRH 124,57 pg/ml  $\pm$ 50,14 se mantuvieron inferiores a las concentraciones de E2 bajo el efecto de suero fisiológico 449,28  $\pm$  428,87 (Tabla10).

#### - 11-Ketotestosterona

La variable de dosis en concentraciones de 11-ketotestosterona cumplió con el supuesto de normalidad y el de homocedasticidad de los datos, verificando ambos supuestos ( $p > 0,05$ ).

**Tabla 12**  
*Verificación de supuestos para 11-Ketotestosterona*

	Variable	n	W*	F-value	p-valor
Shapiro Wilks	pg/ml	12	0,88	-	0,15
Levene	pg/ml	12		1,39	0,265

En la tabla 13 se muestra el análisis de varianza para el comportamiento de 11 ketotestosterona circulante en machos adultos *Cichlasoma festae* bajo la acción de GnRH y suero fisiológico, donde no se encontró un efecto significativo de los tratamientos ( $F=0,14$ ;  $p=0,72$ ).

**Tabla 13**

*Análisis de varianza del comportamiento de 11-ketotestosterona circulante en machos adultos*

Fuentes de Variación	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	F-Value	p-valor
Dosis	6623,71	1	6623,71	0,14	0,72 ns
Error	471436,33	10	47143,63		
Total	478060,04	11			

En la tabla 14 se presenta la media de 11-ketotestosterona bajo el efecto de GnRH que fue de 300,92 pg/ml  $\pm$  116,2, un coeficiente de variación de 38,61 %, un valor mínimo de 178,2 pg/ml y un valor máximo de 483,31 pg/ml; mientras bajo el efecto del suero fisiológico 253,94  $\pm$  284,23, un coeficiente de variación de 111,93 %, un valor mínimo de 14,14 pg/ml y un valor máximo de 785,87 pg/mL.

**Tabla 14**

*Estadística descriptiva para el comportamiento del estradiol circulante en machos adultos Cichlasoma festae, bajo la acción de los tratamientos*

Tratamiento	GnRH	Suero
N	6	6
Media	300,92	253,94
Desviación estándar	116,2	284,23
Error estándar	47,44	116,04
Coefficiente de Variación	38,61	111,93
Mínimo	178,2	14,14
Máximo	483,31	785,57
Percentil (25%)	211,37	19,64
Percentil (75%)	391,75	289,65

En la tabla 15 encontramos el comportamiento de 11-ketotestosterona, en donde el 16 de julio se realizó la primera toma de sangre, presentando una concentración promedio de 314,04 pg/ml  $\pm$  147,70, el 24 de julio se realizó el segundo muestro, presentando una concentración promedio de 284,98 pg/ml  $\pm$  151, se observa una disminución de la concentración en 20 pg/ml

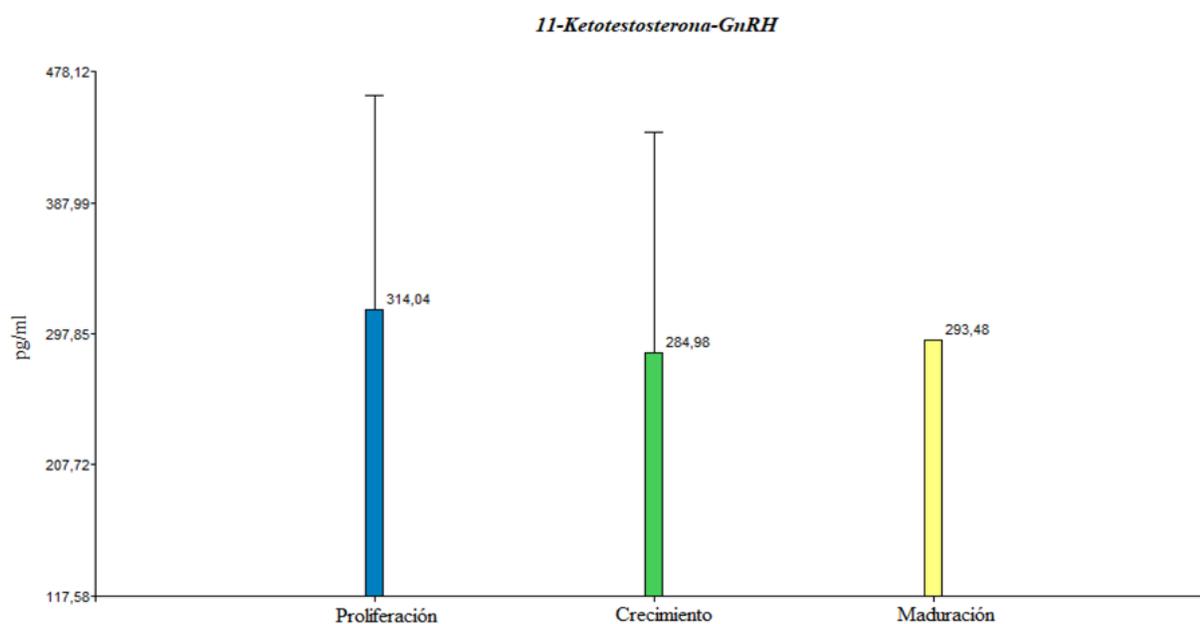
aproximadamente y el 31 de julio se realizó el tercer muestreo donde presento una concentración promedio de 293,48 pg/ml, observándose un aumento en la concentración de unos 9 pg/ml aproximadamente desde el segundo al tercer muestreo bajo el efecto de la GnRH (Figura 42).

Mientras que en el primer muestreo bajo el efecto del suero fisiológico encontramos que la concentración promedio fue de 247,43 pg/ml  $\pm$  142,82, en el segundo muestreo la concentración promedio fue de 402,61  $\pm$  541,59 que demuestra que en este caso la concentración aumento 220 pg/ml aproximadamente respecto al primer muestreo y en el tercer muestreo la concentración fue de 289,65 pg/ml disminuyendo así en 100pg/ml aproximadamente con referencia al segundo muestreo (Tabla 15, Figura 43). Las concentraciones de 11-ketotestosteron bajo el efecto de suero fisiológico 253,94  $\pm$  284,23 fue menor a la concentración bajo el efecto de la GnRH 300,92 pg/ml  $\pm$  116,2, en 45 pg/ml promedio aproximadamente en total de los tres muestreos (Tabla14).

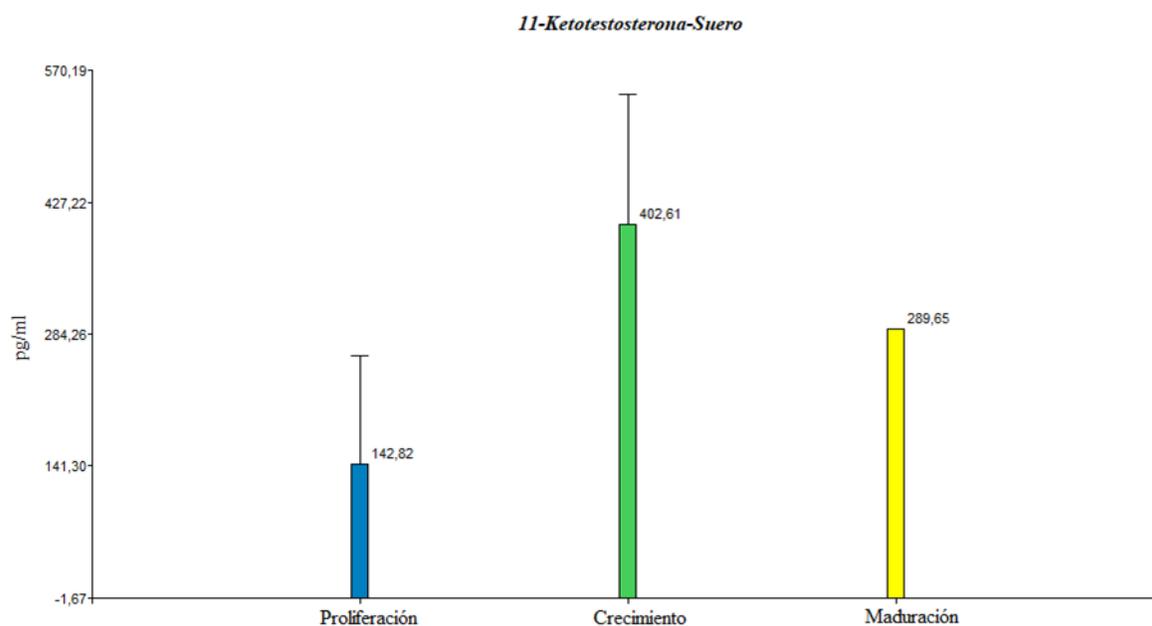
**Tabla 15**

*Estadística descriptiva de las concentraciones de 11- ketotestosterona circulante en machos adultos Cichlasoma festae, bajo la acción de los tratamientos*

	<b>GnrH VR 1</b>	<b>GNRH VR 2</b>	<b>GnrH VR 3</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desvest</b>	<b>CV</b>
Toma 1	483,31	211,37	247,43	314,04	147,70	47,03
Toma 2		178,20	391,75	284,98	151,00	52,99
Toma 3			293,48	293,48		
	<b>SF VR 1.1</b>	<b>1SF VR 2.1</b>	<b>SF VR 3.1</b>			
Toma 1	14,14	166,88	247,43	142,82	118,49	82,97
Toma 2		785,57	19,64	402,61	541,59	134,52
Toma 3			289,65	289,65		



**Figura 42.** Promedio  $\pm$  desviación estándar de las concentraciones de 11-Ketotestosterona (pg/ml) bajo el efecto de GnRH



**Figura 43.** Promedio  $\pm$  desviación estándar de las concentraciones de 11-Ketotestosterona (pg/ml) bajo el efecto del suero fisiológico

Tacon et al (2000) menciona que el nivel plasmático de testosterona bajo el efecto de GnRH presentó un aumento general de 20-30 pg/ml en el día 6 y aproximadamente 25 pg / ml en el día 27. Sin embargo, el aumento fue muy lento antes del día 6, y las concentraciones tendieron a fluctuar durante la mitad del ciclo; en fin se observó una disminución transitoria entre el día 12 y 18. Esto es similar con las concentraciones encontradas en nuestro proyecto ya que al día 7 de la inoculación se presentó 314,04 pg/ml  $\pm$  147,70, mientras en los días 14 y 21 se encontraron concentraciones de 284,98 pg/ml  $\pm$  151 y 293,48 pg/ml respectivamente (Tabla15, Figura42).

Okuzawa (2016) menciona que los el grupo control mantuvo el mismo nivel de 11-ketotestosterona, ya que la inyección no afectó a los niveles plasmáticos de 11 ketotestosterona durante todo el experimento, valores que no coinciden con los del presente estudio ya que bajo el efecto de suero fisiológico se observó un aumento a los 14 días con una concentración promedio de 402,61  $\pm$  541,59, mientras que a los 7 y 21 días presento una concentración de 247,43 pg/ml  $\pm$  142,82 y de 289,65 pg/ml respectivamente (Tabla15, Figura43).

De acuerdo a García, (2005) varias especies como *Engraulis ringes* bajo cautiverio reprimen el estímulo hormonal y no logran alcanzar su desarrollo gonadal final por lo que el uso de hormonas análogas es una alternativa para obtener concentraciones alta de 11-ketotestosterona y que permitan la espermiación, teniendo en cuenta que una inyección de GnRH induce un incremento inmediato en los niveles plasmáticos de GtH en muchos peces, durante un período corto de tiempo en el cual muchas veces es inhibido debido también a que los individuos no se encuentran en las condiciones adecuadas como en los parámetros ambientales ya que la luz, temperatura y fotoperiodo afecta para la activación en la hipófisis (Cisneros, 2007).

#### 4.2.1 Parámetros productivos: índice gonadosomático, fecundidad absoluta y fecundidad relativa

Durante cada muestreo (3 en total), se procedió a sacrificar individuos, machos y hembras para obtener las gónadas y realizar los respectivos análisis. La masa gonadal de los individuos inoculados con GnRH fue de  $0,69 \pm 0,75$  g, mientras de los individuos inoculados con suero fisiológico fue de  $1,52 \pm 2,18$  g. El índice gonadosomático se lo realiza de las hembras, con la masa corporal de cada individuo y la masa gonadal. El índice gonadosomático de las hembras inoculadas con GnRH, en promedio fue de  $0,453 \pm 0,30$  %, mientras que para las hembras inoculadas con suero fisiológico en promedio fue de  $1,255 \pm 1,77$  % (Tabla 16).

**Tabla 16**

*Índice gonadosomático de Cichlasoma festae durante su maduración gonadal en la hacienda El Prado*

<b>GnRH</b>				
<b>Nombre</b>	<b>Peces</b>	<b>Masa corporal(g)</b>	<b>Masa gónada (g)</b>	<b>Índice gonadosomático (%)</b>
Pareja 1	Hembra	256	1,95	0,768
	Macho	436		
Pareja 2	Hembra	197	0,82	0,418
	Macho	119	0,3	
Pareja 3	Hembra	150	0,26	0,174
	Macho	156	0,12	
Promedio		$219 \pm 116,34$	$0,69 \pm 0,75$	$0,453 \pm 0,30$
<b>Suero fisiológico</b>				
Pareja 4	Hembra	215	0,59	0,225
	Macho	402		
Pareja 5	Hembra	169	5,4	3,301
	Macho	139	0,71	
Pareja 6	Hembra	188	0,45	0,24
	Macho	265	0,41	
Promedio		$229,67 \pm 94,66$	$1,52 \pm 2,18$	$1,255 \pm 1,77$

El índice gonadosomático es el cálculo del peso de la gónada como porcentaje del peso total del cuerpo, el cual se utiliza para medir la madurez sexual en relación con el desarrollo sexual de los ovarios, existe una relación entre el índice gonadosomático y el volumen de ovocitos de un individuo, además alcanza un valor máximo antes del desove (Rosales, 1997).

En la presente investigación el índice gonadosomático de las hembras inoculadas con GnRH fue de  $0,453 \pm 0,30$  %, mientras que para las hembras inoculadas con suero fisiológico fue de  $1,255 \pm 1,77$  %, en un periodo de 28 días que duró la fase experimental, cabe recalcar que las hembras de *Cichlasoma festae* fueron capturadas de su ambiente natural y sometidas a un proceso de adaptación al sistema RAS, por ello no se tiene uniformidad en el desarrollo gonadal de la especie, en comparación a lo mencionado por (Beltrán, Sánchez, Valdez, & Ortega, 2010)

De acuerdo a Beltrán, et al. (2010), al analizar el comportamiento del índice gonadosomático IG en *Oreochromis aureus*, en los meses invernales de enero a marzo, se observó valores bajos de IG, a partir del mes de marzo se evidenció un aumento en los valores de IG y en la maduración, se evidenció un mayor incremento de los valores de IG en los meses de julio a septiembre. El índice gonadosomático llegó a  $2,2 \pm 0,7\%$ .

De acuerdo a Komolafe & Arawomo (2007), en su estudio “Estrategia reproductiva de *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae) en el embalse de Opa, Ile-Ife, Nigeria” determinó en las hembras, el índice gonadosomático de  $1.34 \pm 0.01$  % con valores entre 0.12 y 4.06 %. El índice gonadosomático aumentó con el desarrollo gonadal en las hembras, estos índices disminuyen en los peces después del desove.

De acuerdo a Rosales (1997) en su estudio “Efecto de la alimentación sobre los desoves de la cabrilla arenosa *Paralabrax maculatofasciatus* (Teleostei: Serranidae) mantenida en cautiverio”

determinó que el tipo de alimentación implementada influye en el índice gonadosomático, mostrándose valores entre  $6,16 \pm 0,63$  y  $14,91 \pm 1,48$ , demostrando que existen factores que influyen en la reproducción de los peces, los cuales deben ser considerados para lograr procesos reproductivos exitosos en cautiverio (Tabla 16).

En la presente investigación se determinó la fecundidad absoluta de las hembras inoculadas GnRH fue de  $2676 \pm 1325,24$  ovocitos y fecundidad relativa de  $13,94 \pm 7,10$  y la fecundidad absoluta de las hembras inoculadas con suero fisiológico fue de  $1568 \pm 582,98$  ovocitos y fecundidad relativa de  $8,06 \pm 2,05$ .

**Tabla 17**  
*Fecundidad absoluta y relativa de Cichlasoma festae*

GnRH						
Nombre	Peces	Masa corporal (g)	Masa gónada (g)	Fecundidad absoluta (Número de ovocitos)	Fecundidad Relativa ovocitos/g masa	Diámetro del Ovocito (um)
Pareja 1	Hembra	256	4,34	1840	7,18	667,98
Pareja 2	Hembra	197	1,95	4204	21,34	398,07
Pareja 3	Hembra	150	5,62	1984	13,31	292,03
	Promedio	$201 \pm 53,11$	$3,97 \pm 1,86$	$2676 \pm 1325,24$	$13,94 \pm 7,10$	$452,70 \pm 193,84$
Suero fisiológico						
Pareja 4	Hembra	215	4,21	2182	10,14	241,54
Pareja 5	Hembra	169	1,573	1022	6,05	935,21
Pareja 6	Hembra	188	0,374	1500	7,98	279,01
	Promedio	$190,67 \pm 3,12$	$2,05 \pm 1,96$	$1568 \pm 582,98$	$8,06 \pm 2,05$	$485,25 \pm 390,13$

Según Villacís, (2017), la fecundidad absoluta en *Oreochromis niloticus* de 626 ovocitos y fecundidad relativa de 2,03.

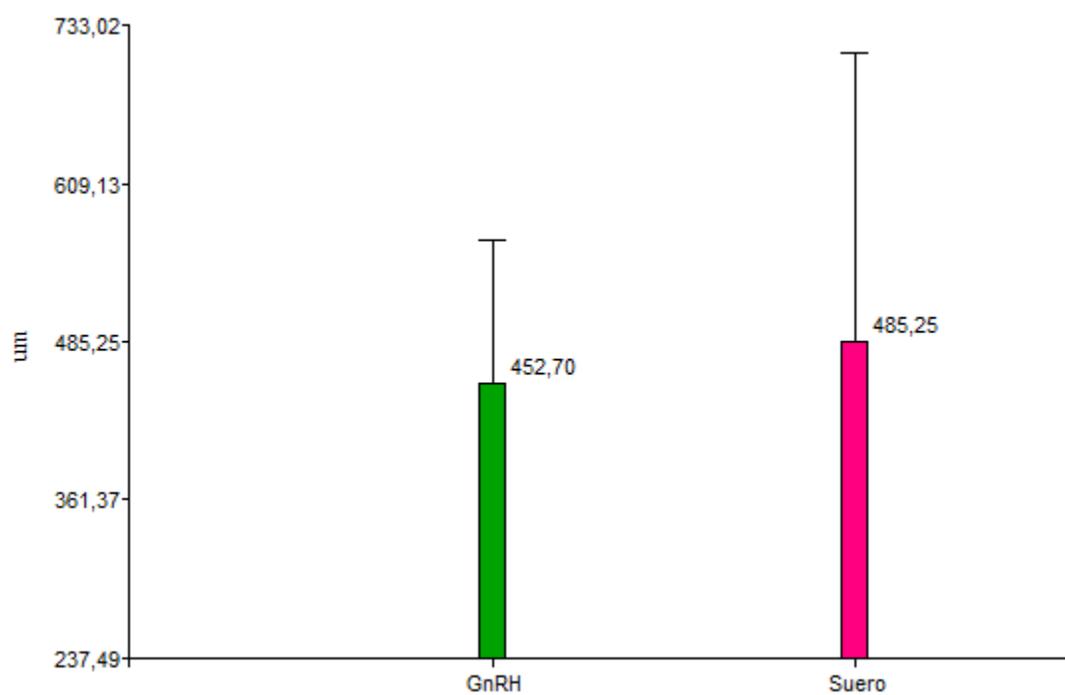
Se realizó la medición de 70 ovocitos promedio por tratamiento con lo que se determinó que con suero fisiológico se obtuvo un tamaño medio de 485,25  $\mu\text{m}$  y un índice gonadosomático de 1,26% pero sin ser significativamente diferente con el de GnRH que obtuvo un tamaño promedio de 452,7  $\mu\text{m}$  y un índice gonadosomático de 0,45% (Tabla 17).

De acuerdo a Villacís (2017), la fecundidad absoluta en *Oreochromis niloticus* de 626 ovocitos y fecundidad relativa de 2,03 ovocitos /g de masa corporal.

De acuerdo a Komolafe, et al. (2007), en su estudio “Estrategia reproductiva de *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae) en el embalse de Opa, Ile-Ife, Nigeria” a fecundidad absoluta fue de 1 810 ovocitos en un pez de 29.7 cm de longitud total, con 23.0 cm de longitud estándar y un peso de 487 g. La fecundidad relativa media fue de  $3.34 \pm 0.11$  ovocitos por / g de peso masa corporal de los peces.

**Tabla 18**  
*Parámetros reproductivos de hembras Cichlasoma festae*

	GnRH		Suero Fisiológico	
	Media $\pm$ SD	CV (%)	Media $\pm$ SD	CV (%)
N	70		66	
IGS (%)	0,45 $\pm$ 0,17	65,86	1,26 $\pm$ 1,02	141,13
Ovocito ( $\mu\text{m}$ )	452,7 $\pm$ 111,91	42,82	485,25 $\pm$ 225,24	80,4

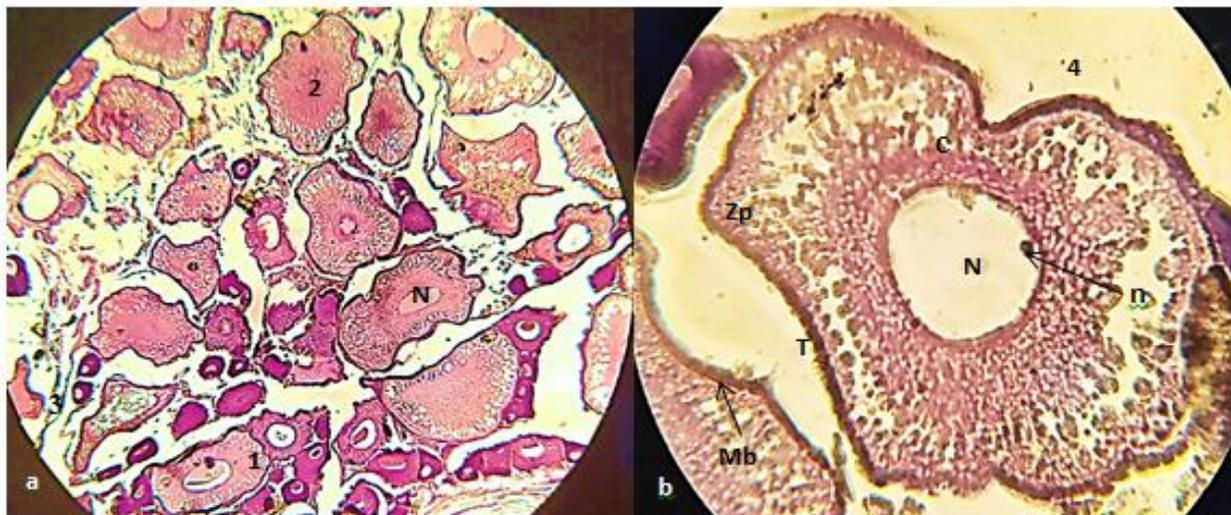


**Figura 44.** Promedio  $\pm$  desviación estándar del diámetro del eje mayor del ovocito ( $\mu\text{m}$ ) de *Cichlasoma festae*

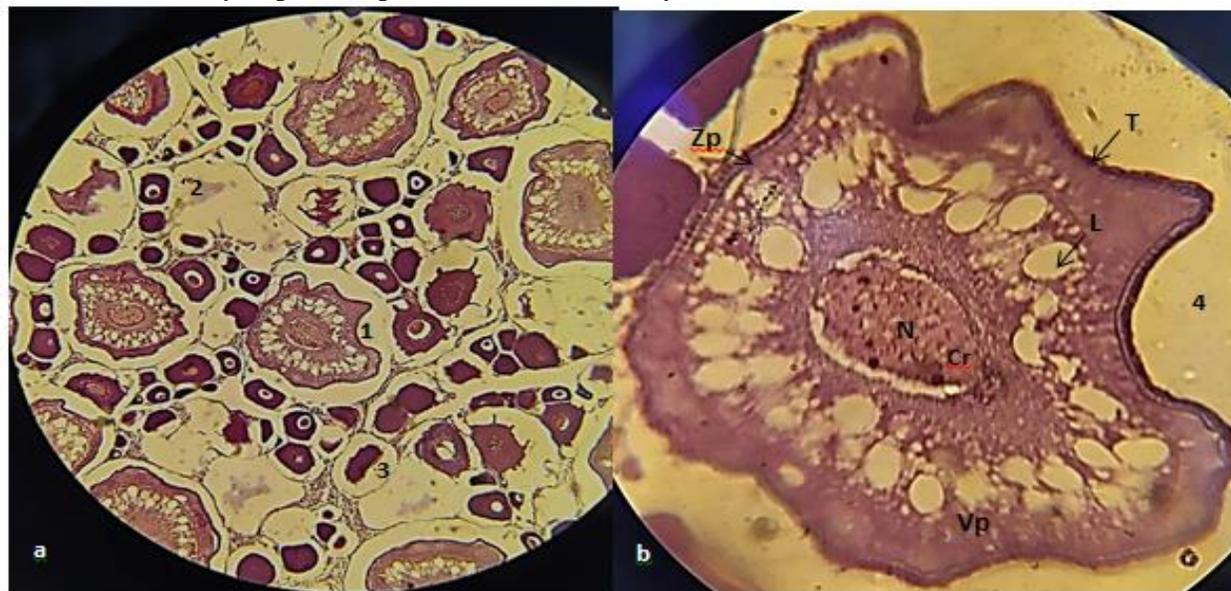
### 4.3 Evaluación de Histología de tejidos gonadales de *Cichlasoma festae*

#### 4.3.1 Evaluación de cambios estructurales en Hembras

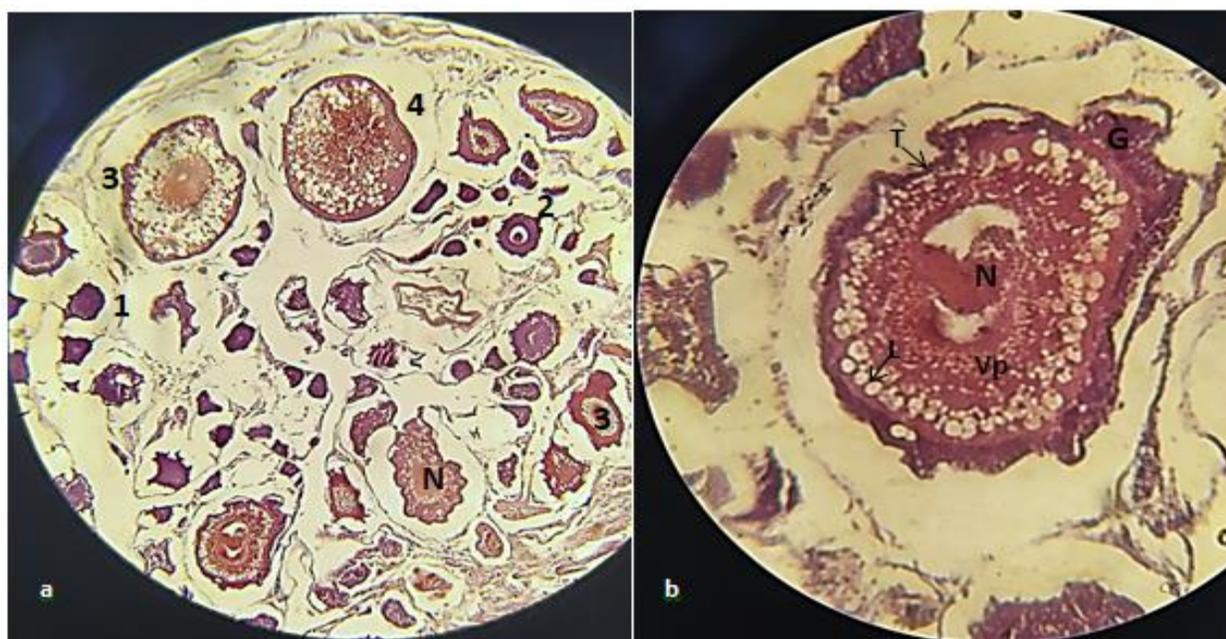
## Estadio II



**Figura 45.** Corte transversal de ovario en estadio II de *Cichlasoma festae* Hembra de GnRH3 (1-4) ovocito previtelogenico tardío, (2) ovocito vitelogenico temprano, (3) ovocito previtelogenico temprano. (N) Núcleo, (n) nucléolos, (C) citoplasma, (Mb) membrana basal, (T) células de la teca y (Zp) zona pelucida. (a) H-E 10x y (b) H-E 40x.



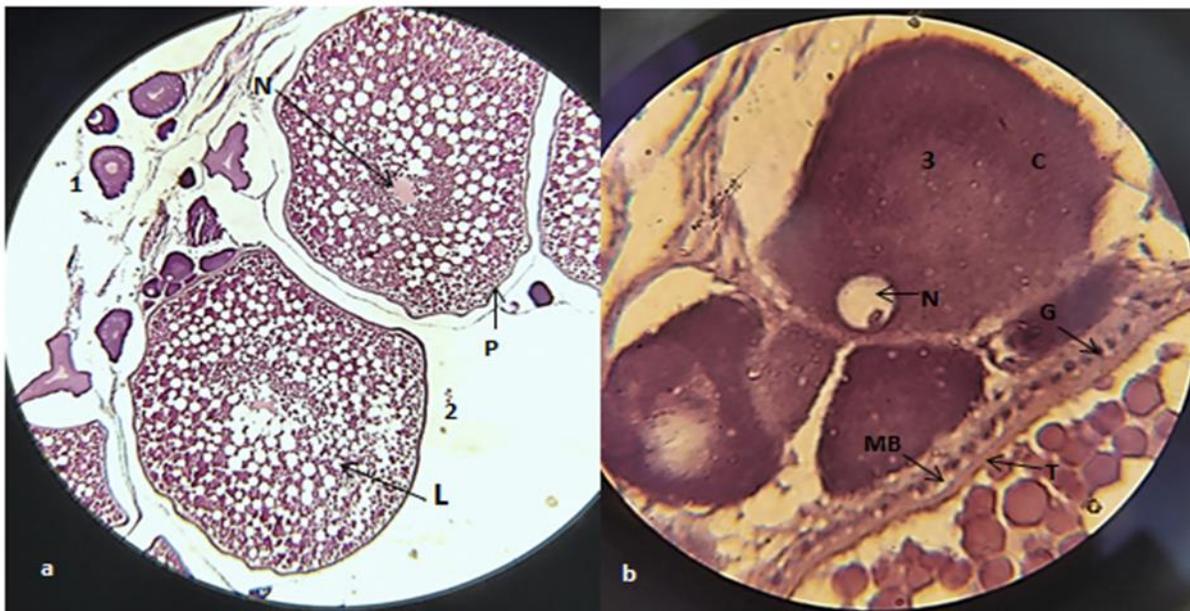
**Figura 46.** Corte transversal de ovario en estadio II de *Cichlasoma festae* Hembra de S.F.H1. (1-4) ovocito vitelogenico temprano, (2) ovocito previtelogenico tardío, (3) ovocito vitelogenico tardío. (N) Núcleo, (n) nucléolos, (Cr) cromosomas plumosos, (L) gota lipídica, (T) células de la teca, (Vp) vitelio proteico y (Zp) zona pelucida. (a) H-E 10x y (b) H-E 40x



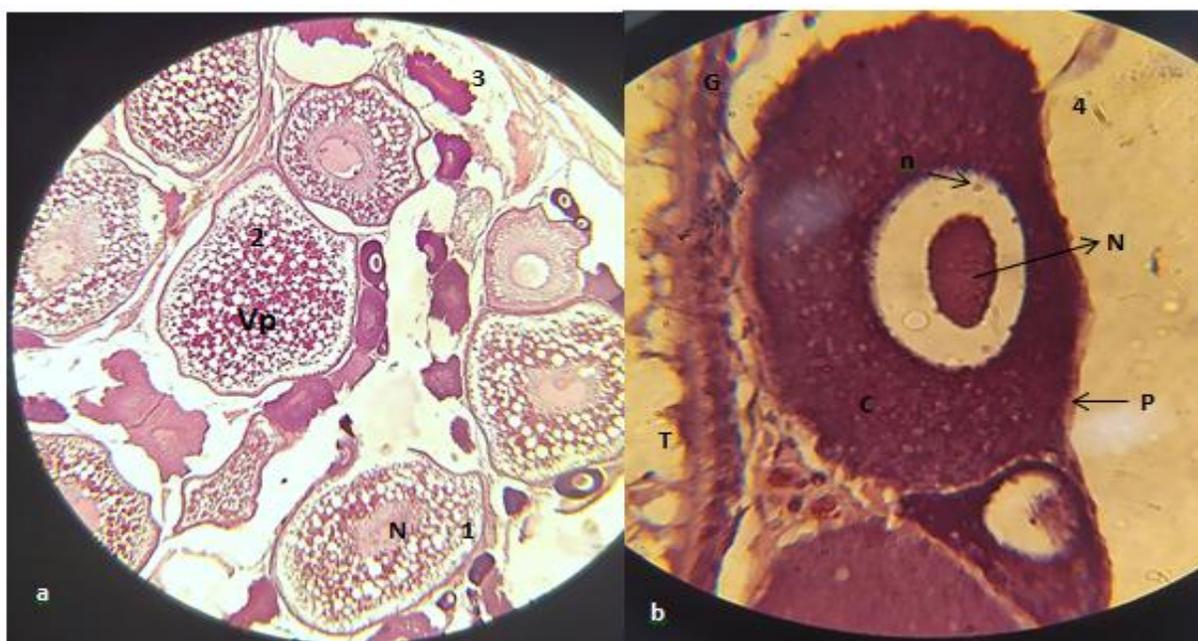
**Figura 47.** Corte transversal de ovario en estadio II de *Cichlasoma festae* Hembra de S.F.H3 (1) Ovogonia, (2) ovocito previtelogenico temprano, (3) ovocito vitelogénico temprano, (4) ovocito vitelogénico tardío. (N) Núcleo, (G) Granulosa, (L) gota lipídica, (T) células de la teca, (Vp) vitelio proteico. (a) H-E 10x y (b) H-E 40x.

En el presente estudio se determinó que las hembras 2GnRH, 1 Sf y 3 Sf se encuentran en estadio II de desarrollo gonadal. Los ovarios presentan ovocitos en estadio de previtelogenesis temprana, ovocito vitelogénico temprano, ovocito vitelogénico tardío, núcleo, células de la granulosa y células de la teca, lo cual coincide por lo mencionado por (Peña, Gómez, & García, 2011). En estadio II de desarrollo ovárico, se observa ovocitos en etapa de previtelogenesis, tuvieron un núcleo prominente, además de ovocitos en vitelogenesis temprana y los ovocitos presentan dos tamaños entre 100-1 000  $\mu\text{m}$  y de 1 001-2 000  $\mu\text{m}$  con número variable de folículos.

### Estadio III



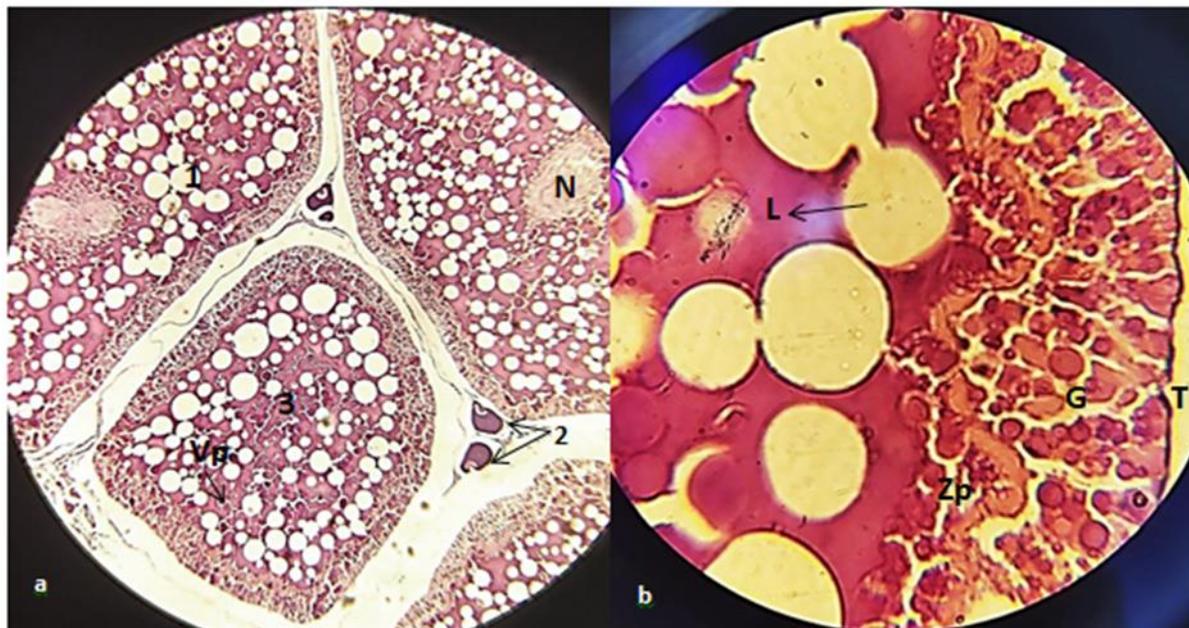
**Figura 48.** Corte transversal de ovario en estadio III de *Cichlasoma festae* Hembra de GnRH1 (1) Folículo en pre-vitelogenesis, (2) ovocito vitelogénico tardío, (3) ovocito vitelogenico temprano, (N) núcleo, (C) citoplasma, (G) granulosa, (L) gota lipídica, (P) pared celular, (Mb) membrana basal y (T) células de la teca. (a) H-E 10x y (b) H-E 100x



**Figura 49.** Corte transversal de ovario en estadio III de *Cichlasoma festae* Hembra de GnRH2 (1-3) ovocito vitelogenico temprano, (2) ovocito vitelogenico tardío (4) ovocito previtelogenico tardío. (N) Núcleo, (n) nucléolos, (C) citoplasma, (G) granulosa, (P) pared celular, (T) células de la teca y (Vp) Vitelo proteínico. (a) H-E 10x y (b) H-E 100x.

De acuerdo a Peña, *et al.* (2011), para el estadio III de desarrollo, existe la presencia de ovocitos tanto en etapa de previtelogénesis como en etapas de vitelogénesis temprana, ya que el ovocito está en maduración. Se observa la pared de los ovocitos dividida en tres capas, células de la teca, membrana basal y células de la granulosa. La capacidad del ovocito para ingresar en la maduración está acompañada del incremento de las uniones intracelulares entre las células de la granulosa e intercelulares entre las células de la granulosa y el ovocito. Durante la presente investigación las hembras 1 y 2 inoculadas con GnRH, se determinó las siguientes estructuras: ovocito vitelogénico temprano, ovocito vitelogénico tardío, ovocito pre-vitelogénico tardío, células de la granulosa, pared celular, células de la teca y vitelo proteínico.

### Estadio IV

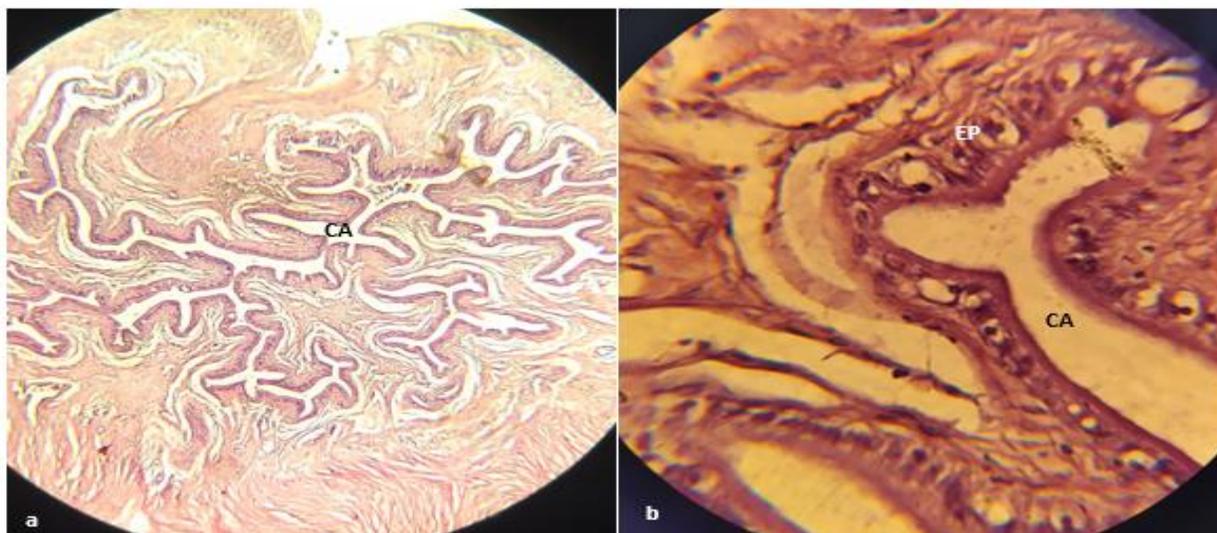


**Figura 50.** Corte transversal de ovario en estadio IV de *Cichlasoma festae* Hembra de S.F.H2 (1) Ovocito vitelogénico temprano, (2) ovocito previtelogenico temprano, (3) ovocito vitelogenico tardío. (N) Núcleo, (G) Granulosa, (L) gota lipídica, (T) células de la teca, (Vp) vitelio proteico y (Zp) zona pelúcida. (a) H-E 10x y (b) H-E 40x.

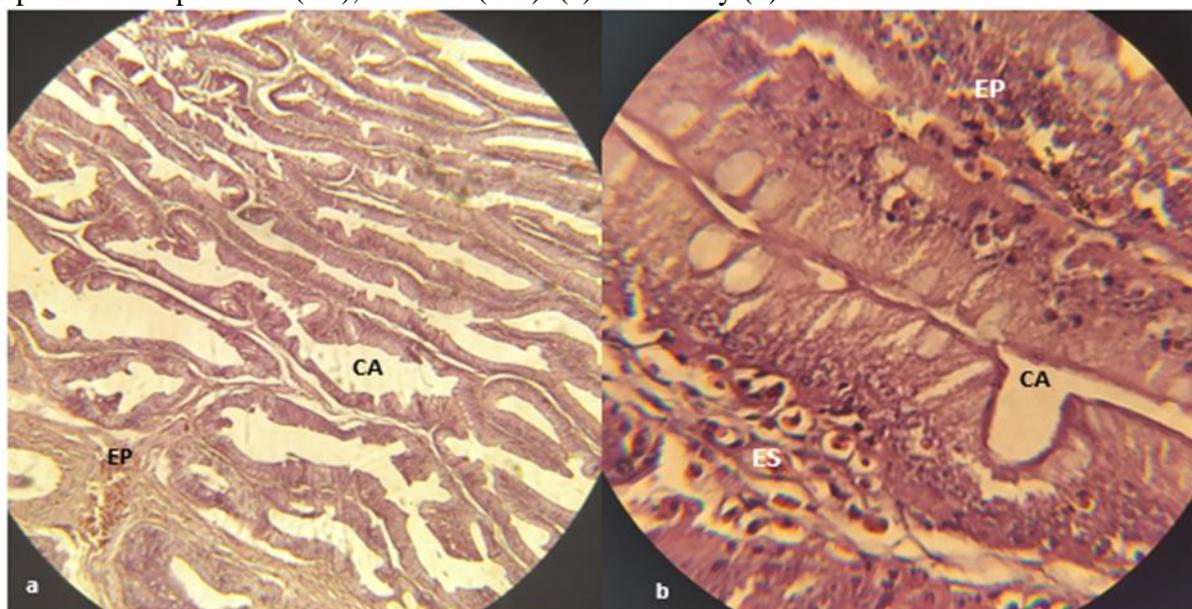
En la presente investigación La hembra 3 inoculada con suero fisiológico está en estadio IV, presentó las siguientes estructuras ovocito vitelogénico temprano, ovocito pre-vitelogénico temprano, ovocito vitelogénico tardío, núcleo, células de la granulosa, células de la teca vitelo proteico y la zona pelúcida. De acuerdo a Peña, et al. (2011), esta etapa es de máxima maduración, el crecimiento vitelogenético y aumentado considerablemente su tamaño; los ovocitos están ocupado casi en su totalidad por gránulos de vitelo y vacuolas lipídicas, el tejido conjuntivo se ha reducido al mínimo y la zona pelúcida se mantiene bien notable.

### 4.3.2 Evaluación de cambios estructurales en Machos

#### Estadío II



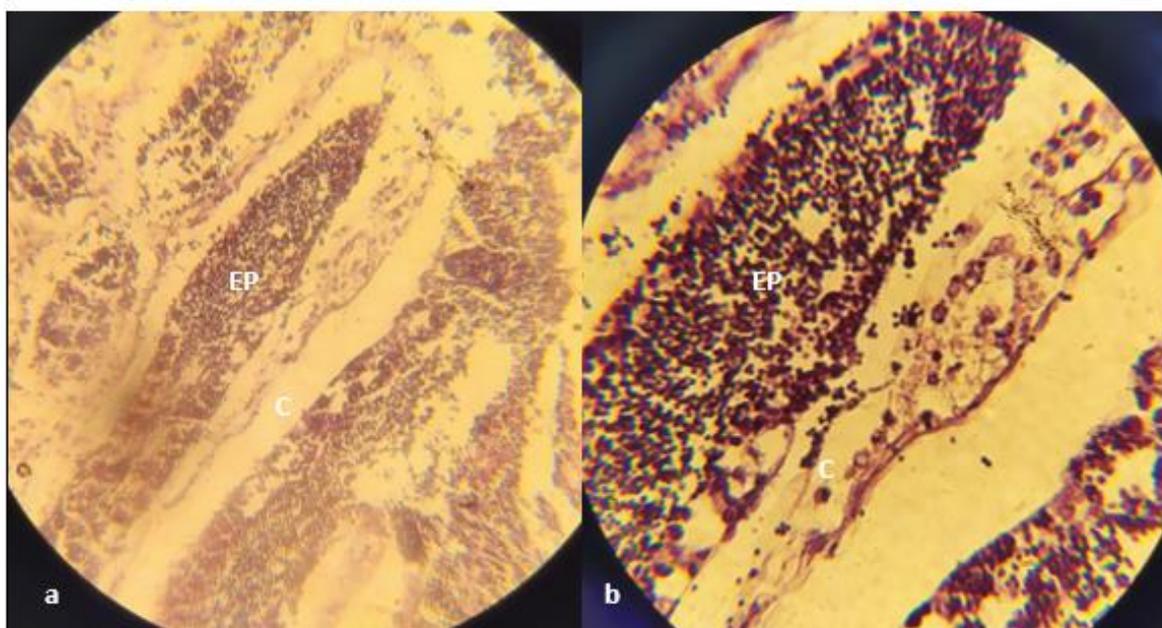
**Figura 51.** Corte transversal de testículo en Estadío II de *Cichlasoma festae* Macho de GnRH2 Espermatocito primario (EP), Canales (CA). (a) H-E 10x y (b) H-E 100x



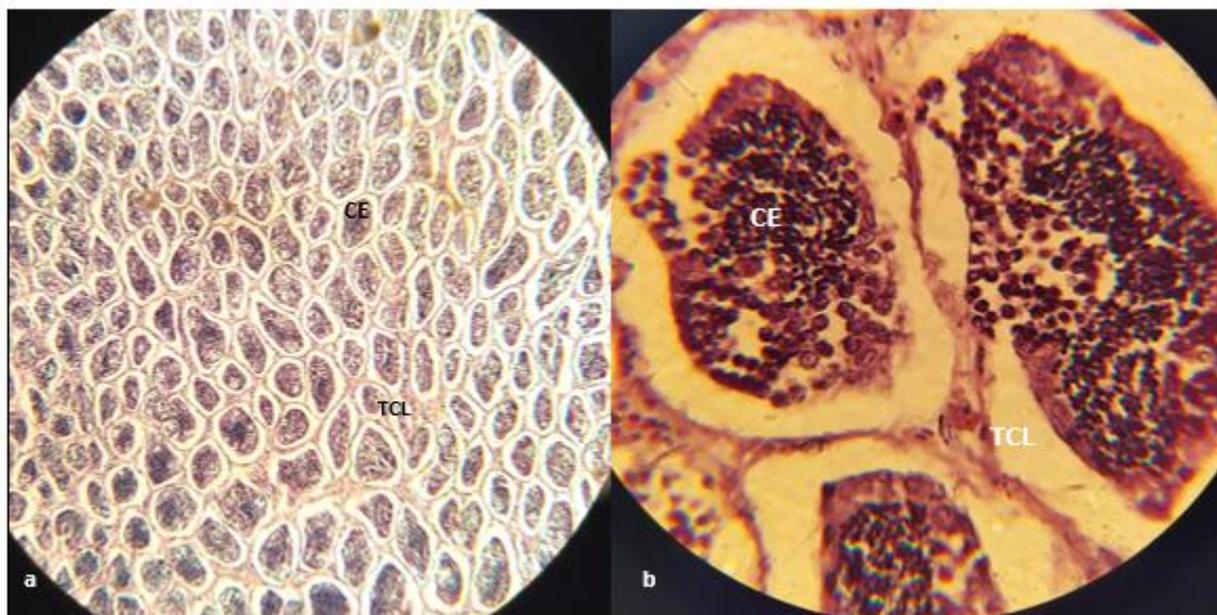
**Figura 52.** Corte transversal de testículo en Estadío II de *Cichlasoma festae* Macho de GnRH3 Espermatocito primario (EP), Canales (CA). (a) H-E 10x y (b) H-E 100x

De acuerdo a Peña, *et al.* (2011), en este estadio II de desarrollo los testículos pueden ocupar entre 10% y 20% de la cavidad celómica, es posible observar algunas espermatogonias, además espermatocitos primarios y secundarios en los lóbulos. En la presente investigación se determinó que los machos inoculados con GnRH se encuentran en estadio II de desarrollo con la presencia de espermatocitos primarios (EP) y la presencia de Canales (CA).

### Estadio III



**Figura 53.** Corte transversal de testículo en Estadio III de *Cichlasoma festae* Macho de S.F.M2 (1) Espermatocito primario (EP), Cistos (C). (a) H-E 40x y (b) H-E 100x

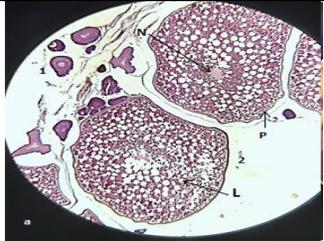
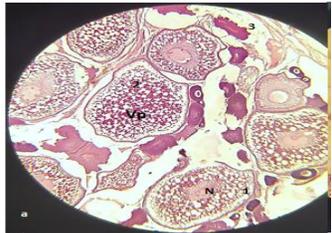
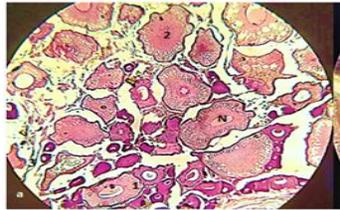


**Figura 54.** Corte transversal de testículo en Estadío III de *Cichlasoma festae* Macho de S.F.M3 Células espermáticas (CE), Tejido conectivo liso (TCL), Cistos (C). (a) H-E 10x y (b) H-E 100x

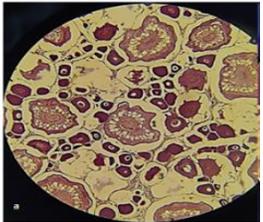
De acuerdo a Peña, *et al.* (2011), en este estadío III o de maduración es posible observar que los lóbulos se encuentran llenos de células espermatogénicas, además de tejido conectivo liso. En la presente investigación se determinó que los machos inoculados con suero fisiológico se encuentran en estadío III con la presencia de células espermáticas (CE), Tejido conectivo liso (TCL) y Cistos (C).

#### 4.4 Resumen

**Tabla 19***Resumen de parámetros productivos de hembras bajo el efecto de la GnRH*

Individuo/Masa corporal	Fecha	Concentración de Estradiol (pg/ml)	Fecundidad Absoluta	Fecundidad Relativa	Diámetro del ovocito (um)	Índice Gonadosomático (%)	Estadio
Hembra 1 256g	16/7/2019	95,76	1840	7,18	667,98	0,768	 <p>Estadio III</p>
Hembra2 197 g	24/7/2019	224,83	4204	21,34	398,07	0,418	 <p>Estadio III</p>
Hembra 3 150 g	31/7/2019	118,29	1984	13,31	292,03	0,174	 <p>Estadio II</p>

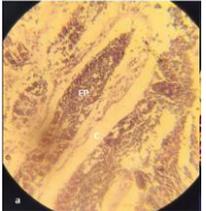
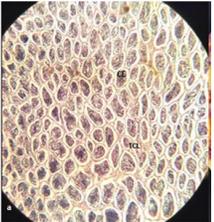
**Tabla 20***Resumen de parámetros productivos de hembras bajo el efecto del suero fisiológico*

Individuo/Masa corporal	Fecha	Concentración de Estradiol (pg/ml)	Fecundidad Absoluta	Fecundidad Relativa	Diámetro del ovocito	Índice Gonadosomático (%)	Estadio
Hembra 1 215 g	16/7/2019	105,98	2182	10,14	241,54	0,225	 Estadio II
Hembra 2 169 g	24/7/2019	120,3	1022	6,05	935,21	3,301	 Estadio IV
Hembra 3 188g	31/7/2019	1029,09	1500	7,98	279,01	0,24	 Estadio II

**Tabla 21**  
*Resumen de parámetros productivos de machos bajo el efecto de la GnRH*

Individuo/Masa corporal	Fecha	Concentración de 11-Ketotesterona (pg/ml)	Masa Gónada (g)	Estadio
Macho 1 436 g	16/7/2019	483,31	-	-
Macho 2 119 g	24/7/2019	178,2	0,3	 Estadio II
Macho 3 156 g	31/7/2019	293,48	0,12	 Estadio II

**Tabla 22**  
*Resumen de parámetros productivos de machos bajo el efecto del suero fisiológico*

Individuo/Masa corporal	Fecha	Concentración de 11-Ketotesterona (pg/ml)	Masa Gónada (g)	Estadío
Macho 1 402g	16/7/2019	14,14	-	-
Macho 2 139g	24/7/2019	785,57	0,71	 Estadío III
Macho 3 265g	31/7/2019	289,65	0,41	 Estadío III

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

- La hembra de vieja roja tiene un color rojizo y verde, más intenso y vivo que los machos, los cuales presentan un color más oscuro que las hembras, un color verde militar en su mayoría y además de un mayor tamaño. Los peces de vieja roja machos y hembras presentan puntos de color azul.
- La ganancia de peso se evidenció a partir del 9 de julio del 2019, hasta el 31 de julio del 2019, una vez adaptadas al suministro de balanceado evidenció la ganancia de peso tuvo un promedio de 4,3 g para los individuos inoculados con GnRH, la conversión alimenticia con 12,7 y la eficiencia alimenticia de 2,6, mientras que para los individuos inoculados con suero fisiológico fue de 4 g y conversión alimenticia fue de 17,8 y la eficiencia alimenticia de 1,4
- Se observó que no hubo el efecto de la GnRH en las concentraciones de estradiol en un rango de 96,96 hasta los 118,29 pg/mL, mientras con suero fisiológico se encuentra en un rango de 63,21 a 1023 pg/mL. Las concentraciones de 11-Ketotestosterona varían por individuo desde 68 a 130,38 pg/mL y no detectó diferencias por efecto de la GnRH. En donde se determina que permite en las hembras mantener una maduración gonadal continua mientras que en los machos no causa ningún efecto.
- Se determinó la Fecundidad absoluta de las hembras con GnRH de  $2676 \pm 1325,24$  ovocitos y fecundidad relativa de  $13,94 \pm 7,10$  ovocitos/g de masa corporal, con un diámetro del ovocito de  $452,70 \pm 193,84$   $\mu\text{m}$  y las hembras testigo, fecundidad absoluta de  $1568 \pm 582,98$  ovocitos y fecundidad relativa de  $8,06 \pm 2,05$  ovocitos/g de masa corporal. Se realizó la medición de 70

ovocitos promedio por tratamiento con lo que se determinó que el testigo se obtuvo un tamaño medio de  $485,25 \pm 390,13 \mu\text{m}$  y un índice gonadosomático de 1,26% pero sin ser significativamente diferente con el de GnRH que obtuvo un tamaño promedio de 452,7  $\mu\text{m}$  y un índice gonadosomático de 0,45%.

## 5.2 Recomendaciones

- Se recomienda el uso de suero fisiológico en futuros estudios para comprobar su efecto en la maduración de oocitos, espermiación y desoves.
- Para obtener una mejor respuesta en las concentraciones de los principales esteroides sexuales se recomienda el uso de pituitaria de tilapia o vieja roja que sean pertenecientes a la familia *Cichlidae*.
- Se recomienda realizar un estudio del perfil enzimático de la especie para lograr determinar el alimento balanceado específico para *Cichlasoma festae* para suplir su requerimiento alimenticio y obtener una mayor ganancia de peso así como favorecer a su adaptación en cautiverio.
- Se recomienda empezar un plan de mejoramiento de la especie en su proceso reproductivo en las futuras generaciones de reproductores nacidos en cautiverio.
- Aumentar el tamaño de muestra poblacional en futuros ensayos para tener mayor validez de la información obtenida.
- Para futuros estudios se recomienda mediante ecografía determinar el estado gonadal de los individuos de *Cichlasoma festae*, de acuerdo a esto se podrá implementar un plan de manejo reproductivo más eficiente.

### 5.3 Bibliografía

- Barriga, R. (23 de 07 de 2011). *Lista de peces de agua dulce e intermareales del Ecuador*.  
Obtenido de [http://bibdigital.epn.edu.ec/202012Politecnica30%283%29.pdfbitstream/15000/5068/4/Peces%20agua%20dulce-intermareales%20Ecuador%](http://bibdigital.epn.edu.ec/202012Politecnica30%283%29.pdfbitstream/15000/5068/4/Peces%20agua%20dulce-intermareales%20Ecuador%20)
- Beltrán, R., Sánchez, J., Valdez, G., & Ortega, A. (2010). Edad y crecimiento de la mojarra de *Oreochromis aureus* en la Presa Sanalona. *Revista Biología Tropical*, 1(58).
- Carrillo, M. (2009). *Carrillo, M. (2009). La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura*. Madrid: Fundación Observatorio Español de Acuicultura.
- Castro, L. (2011). *Descripción histológica gonadal de cinco especies demersales*. Magdalena: Universidad Jorge Tadeo Lozano.
- Cisneros, P. (2007). Efecto de la inyección de un análogo de GnRH sobre la maduración final ovocitaria y perfiles plasmáticos de esteroides gonadales en anchoveta peruana. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, 50-62.
- Cruz, P., Velasco, Y., & Medina, M. (2006). *Manejo hormonal de la función reproductiva de peces tropicales bajo condiciones de cautiverio*. Villavicencio: Universidad de los Llanos.
- Fao. (22 de 09 de 2018). *La reproducción de los peces*. Obtenido de [http://www.fao.org/tempref/FI/CDrom/FAO\\_Training/FAO\\_Training/General/x6709s/x6709s09.htm](http://www.fao.org/tempref/FI/CDrom/FAO_Training/FAO_Training/General/x6709s/x6709s09.htm)
- Fernández, M. (2011). *Características de la reproducción en peces*. Obtenido de [https://unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/cdcitra/Informes\\_Finales\\_Investigacion/Julio\\_2011/IF\\_MARILUZ\\_FERNANDEZ\\_FIPA/CAP%20I%20Y%20II.PDF](https://unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/cdcitra/Informes_Finales_Investigacion/Julio_2011/IF_MARILUZ_FERNANDEZ_FIPA/CAP%20I%20Y%20II.PDF)
- Gómez, N. (2012). *Efecto de los esteroides sobre la dinámica de las células germinales testiculares de pez cebra*. (C. n. CONAMA2012, Ed.) Obtenido de <http://www.conama11.vsf.es/conama10/download/files/conama11/CT%202010/1896707387.pdf?fbclid=IwAR3sO4hR-ECv0Y2LsGO9SPf3RNofD0b8IJAnQAmwg6SFq-XaewG9QKO1j8>

- González, M. (18 de 05 de 2017). *Características morfológicas, métricas de la canal y de la carne de especies de pez nativas de agua dulce de Ecuador*. Obtenido de <https://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/15214/2017000001642.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Jiménez, R. (12 de 08 de 2009). *Mecanismo de regulación, control hormonal y no hormonal en la actividad sexual de los peces teleósteos*. Obtenido de <http://www.smarvet.com/2014/10/mecanismo-de-regulacion-control.html>
- Kiewek, N. (2009). *Inducción hormonal al desove, esteroides sexuales y descripción gonadal en el ciclo reproductivo*. Mexico: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Obtenido de <https://www.oceandocs.org/handle/1834/3409>
- Luna, S. (2013). *Cichlasoma festae Guayas cichlid*. Obtenido de <http://www.fishbase.se/Summary/SpeciesSummary.php?id=12308&lang=spanish>
- Martos, J., Cádiz, L., Martínez, G., & Mancera, J. (18 de 06 de 2015). *Procesos osmorreguladores en peces teleósteos: control mediado por diferentes sistemas endócrinos*. Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/268522444\\_Procesos\\_osmorreguladores\\_en\\_peces\\_teleosteos\\_control\\_mediado\\_por\\_diferentes\\_sistemas\\_endocrinos/download](https://www.researchgate.net/publication/268522444_Procesos_osmorreguladores_en_peces_teleosteos_control_mediado_por_diferentes_sistemas_endocrinos/download)
- Ortega, G. (2015). *Obtención de un hidrolizado de proteína de vieja azul, utilizando enzimas proteolíticas*. Machala: Universidad Técnica de Machala.
- Peña, B., Gómez, J., & García, A. (2011). Ciclo reproductor e histología de las gónadas de tilapia. *Ciencia Pesquera*, 19(2), 23-36.
- Revelo, W., & Laaz, E. (2012). *CATÁLOGO DE PECES DE AGUAS CONTINENTALES DE LA PROVINCIA DE LOS RÍOS -ECUADOR*. Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/304012205\\_CATALOGO\\_DE\\_PECES\\_DE\\_AGUAS\\_CONTINENTALES\\_DE\\_LA\\_PROVINCIA\\_DE\\_LOS\\_RIOS\\_-ECUADOR](https://www.researchgate.net/publication/304012205_CATALOGO_DE_PECES_DE_AGUAS_CONTINENTALES_DE_LA_PROVINCIA_DE_LOS_RIOS_-ECUADOR)
- Rodríguez, J., Moya, A., & Duarte, P. (2015). *Aplicación de la colorimetría como instrumento de valoración de los recursos acuícolas nativos en Ecuador: vieja colorada Cichlasoma festae y vieja azul Andinoacara rivulatus*. Quevedo: Universidad técnica estatal de Quevedo.

- Romero, J. (2009). *Anatomía del aparato urogenital de los peces*. (U. d. Sucre-Colombia, Ed.)  
Obtenido de <https://es.slideshare.net/richardchavez22/anatomia-del-aparato-urogenital-de-peces-de-jos-romero-profesor>
- Sedano, F., & Anguis, V. (2016). Calidad del agua en sistemas de recirculación para la acuicultura (SRA) marina. *Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera*, 1-17.
- Skretting. (2018). *Somos los líderes mundiales en RAS (Sistemas de Recirculación de Acuicultura)*. Obtenido de <https://www.skretting.com/es-EC/media/press-releases/somos-los-l-deres-mundiales-en-ras-sistemas-de-recirculaci-n-de-acuicultura/1588902>
- Ureña, F., González, C., Triana, F., & Linares, Y. (2014). *Establecimiento de los parámetros comportamentales relacionados con la reproducción e inducción ambiental de la misma en tres especies de cíclidos nativos de la Orinnoquia colombiana*. Obtenido de [https://www.google.com/search?q=aunap&rlz=1C1NHXL\\_esEC767EC767&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiQzqWKpcbgAhULk1kKHeYdATUQ\\_AUIDigB&biw=686&bih=643](https://www.google.com/search?q=aunap&rlz=1C1NHXL_esEC767EC767&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiQzqWKpcbgAhULk1kKHeYdATUQ_AUIDigB&biw=686&bih=643)
- URS. (Agosto de 2006). *Estudio de Impacto Ambiental Definitivo*. Obtenido de [https://www.elaw.org/system/files/6010\\_Seccion%203-%20Descripcion.pdf](https://www.elaw.org/system/files/6010_Seccion%203-%20Descripcion.pdf)
- Vázquez, G. (2012). *Espermatogénesis, ciclo reproductivo anual y parámetros hematológicos de Cichlasoma dimerus (Teleostei, Perciformes)*. (FCEN-UBA, Ed.) Obtenido de [https://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis\\_n5165\\_ReyVazquez.pdf](https://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n5165_ReyVazquez.pdf)
- Yzasiga, C., & Zelada, E. (2017). *Gametogénesis en peces*. Obtenido de <https://slideplayer.es/slide/11621649/>