

Maduración *in vitro* de ovas de *Brycon henni* (Pisces: Characidae) con dos preparaciones hormonales

In vitro maturation of *Brycon henni* eggs (Pisces: Characidae) with two hormonal preparations

Juan David Montoya Páez^{1,3}, Hermes Pineda Santis¹, Giovanni Restrepo-Betancur²

RESUMEN

La sabaleta (*Brycon henni*) es una especie de interés comercial en Colombia. Una de las principales barreras para los procesos de conservación de esta especie es la asincronía temporal entre los ciclos reproductivos de las hembras y los machos, que podría ser solucionado mediante el uso de procesos biotecnológicos. El objetivo de esta investigación fue evaluar la maduración *in vitro* de ovas de sabaleta (*Brycon henni*) mediante el uso de dos preparaciones hormonales. Un total de 1200 ovas fueron sometidas a maduración *in vitro* en presencia de extracto de hipófisis de carpa (EPC), hormona liberadora de gonadotropinas de salmón (sGnRHa) y un control sin estimulación hormonal. Las ovas se incubaron durante 2 horas a 25 °C en agitación orbital constante y 80% de O₂. Se evaluó la maduración *in vitro* de las ovas mediante la clasificación de la posición del núcleo en cuatro categorías: migratorio, central, atrésico y periférico. Se encontraron resultados superiores de avance de la maduración por la presencia de núcleo migratorio ($p < 0.05$) para EPC ($46.0 \pm 8.4\%$) y sGnRHa ($40.0 \pm 13.3\%$), en comparación con el control ($24.0 \pm 9.6\%$). Se concluye que el uso de las preparaciones hormonales EPC y sGnRHa durante la maduración *in vitro* promueve el avance de la maduración de las ovas de sabaleta (*Brycon henni*).

Palabras clave: hormonas; maduración *in vitro*; peces; reproducción

¹ Facultad de Ciencias Agrarias, Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Medellín, Colombia

² Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia

³ E-mail: jdmontoya@elpoli.edu.co

Investigación financiada por la Dirección de Investigación y Posgrados del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid

Recibido: 2 de febrero de 2018

Aceptado para publicación: 18 de julio de 2018

ABSTRACT

The 'sabaleta' (*Brycon henni*) is a species of commercial interest in Colombia. One of the main barriers to the conservation processes of this species is the temporal asynchrony between the reproductive cycles of females and males, which could be solved using biotechnological processes. The aim of this investigation was to evaluate the *in vitro* maturation of 'sabaleta' eggs (*Brycon henni*) using two hormonal preparations. A total of 1200 eggs were subjected to *in vitro* maturation in the presence of carp pituitary extract (EPC), salmon gonadotropin-releasing hormone (sGnRH α) and a control without hormonal stimulation. The eggs were incubated for 2 hours at 25 °C in constant orbital shaking and 80% O₂. The *in vitro* maturation of the eggs was evaluated by classifying the position of the nucleus in four categories: migratory, central, atretic and peripheral. Higher maturation advancement were obtained due to the presence of migratory nucleus ($p < 0.05$) for EPC ($46.0 \pm 8.4\%$) and sGnRH α ($40.0 \pm 13.3\%$), compared to the control ($24.0 \pm 9.6\%$). It is concluded that the use of EPC and sGnRH α hormonal preparations during *in vitro* maturation promotes the advancement of maturation of 'sabaleta' eggs (*Brycon henni*).

Key words: hormones; *in vitro* maturation; fishes; reproduction

INTRODUCCIÓN

La sabaleta *Brycon henni* (Eigenmann, 1913) es una especie nativa de peces de la familia Characidae, presente en los pequeños ríos que nacen en la cordillera central de Colombia (Dahl, 1971) y con subpoblaciones distribuidas en los ríos Cauca, Magdalena, San Juan, Dagua y Patía (Montoya-López *et al.*, 2006; Pineda-Santis *et al.*, 2007). Esta especie es endémica, en especial en la cuenca de los ríos Porce y sus afluentes como el Rio Grande, Nus, San Rafael y San Carlos, todos localizados en la zona de embalses del departamento de Antioquia; siendo tal vez la especie euritérmica más representativa, puesto que se encuentra en aguas limpias y transparentes con temperaturas entre los 18 y 28 °C y concentraciones de oxígeno disuelto entre 6 y 10 mg/l (Lenis *et al.*, 2009). En el ámbito reproductivo, se han descrito diversos aspectos de la gametogénesis y la reproducción del género *Brycon* (Arboleda *et al.*, 2005; Gonçalves *et al.*, 2006; Montoya-López 2006). Como peces teleósteos, sus ovarios muestran una estructura general similar a los mamíferos, como órganos pares alargados y

orientados longitudinalmente dentro de la cavidad abdominal (Legac *et al.*, 1993). Los ovarios están compartimentados por septos formados por pliegues del epitelio germinal (laminillas ovígeras) (Jalabert, 2005). Durante la etapa de diferenciación del folículo primario en el huevo, el oocito dentro del folículo ovárico, adquiere la capacidad de formar un embrión viable después de la fertilización (Lubzens, 2010).

El desarrollo de los oocitos se puede dividir en cinco etapas, las cuales son similares entre todos los peces teleósteos: crecimiento primario, estado de alveolos corticales, estado de desarrollo vitelogénico temprano, estado de desarrollo vitelogénico tardío y maduración/ovulación (Leino *et al.*, 2005; Urbatza, 2011). El término maduración de oocitos designa una serie de procesos celulares complejos, que corresponden a la reanudación de la meiosis hasta el segundo arresto en la metafase (Jalabert *et al.*, 1991). En la ovulación, los ovocitos maduros son liberados de su folículo en la cavidad ovárica, antes de ser puestos afuera a través del oviducto y de la papila genital (Kobajashi *et al.*, 2008). La finalización de la segunda división meiótica del

ovocito maduro se produce solo después de la fertilización evidenciando la formación de un óvulo haploide y un cuerpo polar (Urbatza, 2011).

Se conoce que la maduración de los gametos de los peces puede requerir, según la especie, de la estimulación mediante condiciones ambientales como temperatura y salinidad del agua, del uso de estimulación hormonal o de la combinación de ambos (Muller *et al.*, 2005; Kucharczyk *et al.*, 2017). Se han utilizado preparados hormonales con extracto de hipófisis de carpa (EPC) y análogos de GnRH como la hormona liberadora de gonadotropinas de salmón (sGnRHa), combinados con inhibidores o antagonistas de la dopamina (Ovopel, Ovaprim, OvaRH), los cuales actúan como bloqueadores de los factores inhibidores de la liberación de gonadotropinas (GRIF) (Peter *et al.*, 1988), influyen directamente las gónadas y causan la maduración de los oocitos (Kucharczyk *et al.*, 1997, Brzuska, 2006; Jamróz *et al.*, 2008). También se han realizado estudios con estimulación hormonal con gonadotropina coriónica humana (hCG) (Kucharczyk *et al.*, 1997; 2017). Kucharczyk *et al.* (2017) reportaron que la aplicación de un tratamiento con sGnRHa en burbot (*Lota lota* L) sincronizó la maduración final de los ovocitos dando como resultado una alta tasa de supervivencia de los embriones. La estimulación de hembras *Brycon henni* con EPC, Ovopel y Ovaprim influyó en el diámetro de los huevos obtenidos y en su fertilización (Lenis *et al.*, 2009). En otros estudios de inducción hormonal de la especie se reporta el uso de hipófisis de carpa, hipófisis de *Bufo marinus*, LH-RH y hCG (Granados *et al.*, 1986; Zapata y Vanegas, 1993).

La estimulación hormonal para la maduración de los gametos en peces se realiza directamente sobre los animales, de manera que son menos los reportes de maduración *in vitro* de las ovas. Milla *et al.* (2006) implementaron un protocolo de maduración *in vitro* de oocitos en folículos ováricos de

Oncorhynchus mykiss mediante el uso de esteroides, encontrando que el rompimiento de la vesícula germinal (GVBD) solo se presentó después de la estimulación con 17 α ,20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (DHP). En otros estudios se reporta que el tratamiento de folículos ováricos con IGF-I e insulina, aumenta la concentración de la hormona inductora de la maduración DHP en el medio y que IGF-I, IGF-II y b-insulina inducen GVBD en oocitos desnudos (Mukherjee *et al.*, 2006).

La maduración de las ovas puede determinarse mediante la posición de su núcleo, a través de criterios previamente definidos como: vesícula germinal en la posición central (CGV, etapa 1), migración temprana de la vesícula germinal (MGV, etapa 2), migración tardía de la vesícula germinal (más que la mitad del radio – PGV, etapa 3) y vesícula germinal periférica o rompimiento de la vesícula germinal (GVBD, etapa 4) (Brzuska, 1979; Kucharczyk *et al.*, 2005; Targońska *et al.*, 2015). Es así que la madurez de las ovas se expresa a través de la migración de la vesícula germinal (Targońska *et al.*, 2015). Estudios en *Brycon henni* evaluaron las ovas considerando igualmente la posición del núcleo y la presencia de ovocitos atrofiados o deformes (Lenis *et al.*, 2009). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del extracto de hipófisis de carpa (EPC) y la hormona liberadora de gonadotropinas de salmón (sGnRHa) en la maduración *in vitro* de ovas de sabaleta (*Brycon henni*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

El material de investigación (ovas de *Brycon henni*) fue recolectado en la granja experimental piscícola Jhon Jairo González del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, ubicada en el municipio de San Jerónimo (Antioquia, Colombia). Las muestras fueron procesadas y evaluadas en la granja

experimental y en el Laboratorio de Biotecnología Animal del Centro de Experimentación y Laboratorios del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Sede Bello (Antioquia, Colombia). Los animales estuvieron sometidos a condiciones estándar de alimentación, ambiente, manejo general y reproductivo.

Colecta de Ovas

Los peces se manejaron según las directrices publicadas para la experimentación de peces en las Buenas Prácticas en la Producción Acuícola (ICA, 2007). Se utilizaron 20 hembras *Brycon henni*, las cuales fueron anestesiadas por inmersión en solución de benzocaína (1 g/l de agua). Los peces se retiraron del estanque cuando se observó la pérdida del eje de nado y se secó cuidadosamente la papila urogenital para evitar el contacto de las ovas con el agua. Inmediatamente después se procedió a extraer una muestra de ovas de cada hembra, introduciendo un catéter plástico por el oviducto. Luego las ovas se almacenaron en un dispositivo de transporte y se llevaron hasta el laboratorio a temperatura ambiente en un tiempo máximo de tres horas.

Maduración *in vitro*

Las ovas se sometieron por separado durante 2 h a un medio basado en TCM 199 (Gibco®, EEUU), suplementado con dos preparaciones hormonales: extracto de hipófisis de carpa (EPC, Acuagranja, Colombia) u hormona liberadora de gonadotropinas de salmón (sGnRHa, Ovaprim, Syndel, EEUU) a razón de 0.1 mg/ml y 0.1% v/v, respectivamente. Se incluyó un grupo control sin suplementación hormonal. Se tomaron 300 ovas por tratamiento distribuidas en grupos de 10 ovas y fueron puestas en cajas de Petri con 4 ml de medio suplementado, bajo condiciones de incubación a 25 °C en agitación orbital constante a 100 rpm (Thermo Scientific®, EEUU) y condiciones atmosféricas, de acuerdo a un protocolo modificado del descrito por Milla *et al.* (2006).

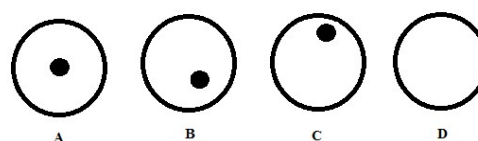


Figura 1. Diagrama de la posición del núcleo en las ovas. A) Central, B) Migratorio, C) Periférico, D) Atrésico

La evaluación de la maduración *in vitro* de las ovas se realizó según la posición de su núcleo, que fue clasificado en cuatro categorías: migratorio, central, periférico o atrésico; considerando criterios reportados por Brzuska (1979) y Lenis *et al.* (2009) (Figura 1). Los huevos fueron aclarados para eliminar la interferencia del vitelo en la observación del núcleo, siendo sometidos a una solución compuesta por 30% de formol, 30% de ácido acético y 40% de alcohol (v/v) durante 2 min. Se consideraron como ovas en proceso de maduración aquellas que presentaron la migración de la vesícula germinal (núcleo migratorio) según lo descrito en investigaciones previas (Kucharczyk *et al.*, 2005; Targońska *et al.*, 2015). La presencia de yemas de coloración blanquecina o heterogénea indicó la no maduración de las ovas (Beltrán *et al.*, 1978).

Análisis Estadístico

Se empleó un diseño completamente al azar. Se ajustó un modelo lineal generalizado para determinar el efecto de las fuentes de variación (grupo de ovas, fecha de recolección y tratamiento) sobre la maduración de las ovas de acuerdo con la posición del núcleo (variable dependiente). Se evaluó la normalidad de los datos mediante una prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para la comparación de las medias entre los tratamientos se utilizó la prueba de Duncan. Todos los análisis fueron realizados mediante el programa SAS v. 9.2 (SAS Inst. Inc., Cary, NC).

Cuadro 1. Distribución de ovas de *Brycon henni* según la posición del núcleo después de la maduración *in vitro*

Posición del núcleo	Media (%)	DE (%)	CV (%)	Máximo	Mínimo
Migratorio	36.7	14.0	38.1	60	10
Central	23.0	11.2	48.6	40	0
Atrésico	35.3	19.8	55.9	80	0
Periférico	2.0	4.8	242.1	20	0

Resultados obtenidos a partir de 10 grupos de ovas sometidas a maduración *in vitro* por tratamiento (10 ovas por grupo). DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

Cuadro 2. Distribución de ovas de *Brycon henni* según la posición del núcleo después de la maduración *in vitro* por tratamiento

Tratamiento	Posición del núcleo			
	Migratorio (%)	Central (%)	Atrésico (%)	Periférico (%)
Control	24.0 ± 9.7 ^a	17.0 ± 11.6 ^a	49.0 ± 23.8 ^a	2.0 ± 4.2 ^a
EPC	46.0 ± 8.4 ^b	25.0 ± 10.8 ^{ab}	26.0 ± 15.0 ^b	3.0 ± 6.7 ^a
sGnRHa	40.0 ± 13.3 ^b	27.0 ± 9.5 ^b	31.0 ± 12.0 ^b	1.0 ± 3.2 ^a

Resultados obtenidos a partir de 30 grupos de ovas sometidas a maduración *in vitro* (10 ovas por grupo). Los resultados se presentan como media ± desviación estándar

Promedios con letras diferentes denotan diferencia significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos

EPC: extracto de hipófisis de carpa; sGnRHa: hormona liberadora de gonadotropinas de salmón

RESULTADOS

A partir de la maduración *in vitro* y la evaluación de la posición del núcleo de cada ova como indicador del estado de maduración se encontró prevalencia de núcleos migratorios, atrésicos y centrales, en este mismo orden. Así mismo, se observó una reducida proporción de núcleos periféricos y una alta variabilidad en la proporción de presentación de estos últimos (Cuadro 1).

Los efectos incluidos en los modelos estadísticos ajustados explicaron en una media a baja proporción la maduración *in vitro* de las ovas según la posición del núcleo, con valores para el coeficiente de determinación

(R^2) de 0.50, 0.43, 0.43 y 0.27 para núcleo migratorio, central, atrésico y periférico, respectivamente. Los efectos fijos de la fecha de colecta y el tratamiento fueron significativos en el modelo ajustado para la evaluación de núcleos atrésicos ($p < 0.05$). En el modelo ajustado para explicar la variabilidad en la presencia de núcleos migratorios solo fue significativo el efecto del tratamiento ($p < 0.05$). No se encontraron efectos significativos en los modelos ajustados para núcleos centrales y periféricos.

Se observaron diferencias entre los tratamientos (control, EPC y sGnRHa) de acuerdo con la posición del núcleo de las ovas, cuando estos fueron catalogados como migratorios, centrales y atrésicos ($p < 0.05$)

(Cuadro 2). Para los núcleos migratorios, el uso de las hormonas EPC y sGnRHa resultó en una tasa superior de ovas en proceso de maduración (migración de la vesícula germinal) en comparación con el tratamiento control ($p < 0.05$). De otro lado, se observó un efecto inverso de ambas hormonas sobre la presentación de núcleos atrésicos, con una reducción significativa respecto al control ($p < 0.05$). La maduración *in vitro* de las ovas en presencia de sGnRHa produjo una proporción superior de ovas con núcleo central respecto al control ($p < 0.05$); sin embargo, no se observó diferencia significativa entre ambas preparaciones hormonales. La suplementación hormonal no generó diferencias en la presencia de núcleos periféricos, lo cual pudo ser influenciado por la reducida proporción de los mismos para todos los tratamientos.

DISCUSIÓN

La sabaleta *Brycon henni* es una especie endémica de las zonas de montaña de Colombia, que se adapta bien a las aguas templadas y cálidas, con la cual desde hace más de tres décadas se ha venido trabajando en varios aspectos de su biología, ecología y reproducción en confinamiento (Lenis *et al.*, 2015). Es catalogada como una especie promisoría para la cría en cautiverio y para el repoblamiento, siendo importante para la seguridad alimentaria de las poblaciones ribereñas de las zonas que habita (Montoya-López *et al.*, 2006). Sin embargo, existe la necesidad de buscar alternativas para la recuperación de esta especie, muy apetecida por la calidad de su carne, lo que ha provocado un descenso considerable en sus índices de captura (Lenis *et al.*, 2009).

Se reporta que existe un posible asincronismo entre los picos de madurez de hembras y machos a lo largo del año (Lenis *et al.*, 2015). En los sistemas de producción piscícola no ha sido todavía posible romper la estacionalidad del ciclo reproductivo (Cruz-

Casallas *et al.*, 2006), siendo por esta razón, que se utilizan hormonas para inducir la madurez y la ovulación, las cuales no son suficientes si no van acompañadas de condiciones ambientales específicas, tales como la temperatura y el fotoperiodo (Kucharczyk *et al.*, 2005, 2017).

Se han desarrollado trabajos de inducción hormonal como alternativa para generar la maduración de ovas de *Brycon henni*. En un estudio de Lenis *et al.* (2009), la estimulación de las hembras con EPC, Ovopel y Ovaprim influyó en el diámetro de los huevos obtenidos y en su fertilización. En el presente estudio donde se indujo la maduración de las ovas en condiciones *in vitro*, se evaluó su estado de maduración mediante la posición del núcleo. En otros estudios con peces del género *Brycon* se ha considerado la migración de la vesícula germinal como un signo de avance en la maduración final de las ovas. Pardo *et al.* (2006) realizaron la inducción de hembras de yamú *Brycon amazonicus* con EPC, encontrando un progreso en la migración de la vesícula germinal con $6.2 \pm 3.2\%$ en estado migrando, $74.9 \pm 5.3\%$ maduro y $18.85 \pm 4.9\%$ en estado atrésico.

En el presente estudio, la EPC y la sGnRHa indujeron la migración de la vesícula germinal, toda vez que se observó un incremento significativo de ovas con núcleo migratorio que coincidió con una menor proporción de ovas atrésicas (Cuadro 2). Incluso se observó un incremento de ovas con núcleos con posición central, que fue significativo al menos para el tratamiento con sGnRHa. Sin embargo, la proporción de ovas con núcleos periféricos correspondientes a la maduración final o GVBD fue bastante reducida, sin diferencia alguna por efecto del tratamiento. Lo anterior, podría interpretarse como un efecto positivo de ambos preparados hormonales en la inducción de la migración de la vesícula germinal, como indicador del avance de la maduración; sin embargo, el efecto de la EPC y la sGnRHa, o las condi-

ciones utilizadas en la maduración *in vitro*, como el tiempo de incubación, el medio utilizado o la agitación durante la incubación, pudieron no ser las necesarias para inducir la maduración final (GVBD). Por otro lado, la reducción de la proporción de ovas atrésicas puede considerarse un evento positivo para la obtención de un gran número de huevos con alta supervivencia durante las primeras etapas de desarrollo, como un evento crucial para la sostenibilidad y el éxito de la acuicultura (Lubzens *et al.*, 2017).

En el caso de la sabaleta, se recomiendan realizar inducciones hormonales exógenas en las hembras cuando el porcentaje de oocitos con núcleo en estado migratorio es superior al 70%. De igual manera, un tamaño de la ova entre 1.5 y 2.0 mm se constituye también como un elemento para evaluar su madurez (Lenis *et al.*, 2015).

De otro lado, no se conocen otros trabajos donde se reporte la maduración *in vitro* de ovas de sabaleta utilizando hormonas de forma exógena como la EPC y la sGnRH α ; sin embargo, para la carpa común *Cyprinus carpa*, se reporta el uso de IGF-I, IGF-II y b-insulina para la maduración de folículos ováricos y oocitos desnudos con altas tasas de GVBD (Mukherjee *et al.*, 2006). De otro lado, Milla *et al.* (2006) implementaron un protocolo de maduración *in vitro* de oocitos en folículos ováricos de *Oncorhynchus mykiss* mediante el uso de esteroides, encontrando que el rompimiento de la vesícula germinal (GVBD) solo se presentó después de la estimulación con 17 α ,20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (DHP).

De acuerdo con los resultados obtenidos y a la escasa información sobre la maduración *in vitro* de ovas de *Brycon henni* y otras especies, se hace necesario evaluar otras alternativas, como el uso de diferentes preparaciones hormonales, acompañadas de condiciones adecuadas de incubación, considerando factores ambientales habituales para el desarrollo y la maduración de las ovas.

CONCLUSIÓN

El uso de preparaciones hormonales de extracto de hipófisis de carpa (EPC) y hormona liberadora de gonadotropinas de salmón (sGnRH α) durante la maduración *in vitro* promueve el avance de la maduración (migración de la vesícula germinal) de las ovas de sabaleta (*Brycon henni*), convirtiéndose en una alternativa para obtención de ovas que puedan ser útiles para los procesos de fertilización fuera de las temporadas reproductivas de la especie.

LITERATURA CITADA

1. **Arboleda L, Olivera MA, Tabares CJ, Echeverri A, Serna DF. 2005.** Madurez gonadal en hembras de sabaleta (*Brycon henni*) y su relación con variables medioambientales. Rev Politécnica 1: 95-103.
2. **Beltrán CN, Beltrán I, Sierra R. 1978.** Notas preliminares sobre la reproducción y cultivo de la sabaleta (*Brycon henni*, Eigenman 1913). Bogotá, Colombia: Instituto de Recursos Naturales. 27 p.
3. **Brzuska E. 1979.** The *in vivo* method of estimating the stages of oocytes maturation in carp *Cyprinus carpio* L. Acta Hydrobiologica 21: 423-433.
4. **Brzuska E. 2006.** Artificial spawning of female Lithuanian strain B carp (*Cyprinus carpio* L) after treatment with carp pituitary homogenate, Ovopel or [D-Tle⁶, ProNHet⁹] GnRH-a (Lecirelin). Aquac Res 37: 264-271. doi: 10.1111/j.1365-2109.2005.01428.x
5. **Cruz-Casallas PE, Medina-Robles VM, Velasco-Santamaría YM. 2006.** Protocolo para la crioconservación de semen de yamú (*Brycon amazonicus* Spix & Agassiz 1829). Rev Colomb Cienc Pec 19: 146-151

6. **Dahl G 1971.** Los peces del norte de Colombia. Bogotá, Colombia: Inderena. 391 p.
7. **Gonçalves TL, Bazzoli N, Brito MFG 2006.** Gametogenesis and reproduction of the matrinxã *Brycon orthotaenia* (Günther, 1864) (Pisces: Characidae) in the São Francisco river, Minas Gerais, Brazil. *Braz J Biol* 66: 513-522. doi: 10.1590/S1519-69842006000300018
8. **Granados H, Sarria A, Galvis D, López J, Ortiz J. 1986.** Reproducción inducida en *Brycon henni* Eigenmann, 1913 (Sabaleta) *Rhamdia wagneri* Gunther (Barbudo). *Rev Vet Zoot Caldas* 5: 68-91.
9. **Jalabert B, Fostier A, Breton B, Weil C. 1991.** Oocyte maturation in vertebrates. In: Pang PKT, Schreibman MP (eds). *Vertebrate endocrinology: fundamentals and biomedical applications*. Part A. San Diego, California: Academic Press. p 23-90.
10. **Jalabert B. 2005.** Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reprod Nutr Dev* 45: 261-279. doi: 10.1051/rnd:2005019
11. **Jamróz M, Kucharczyk D, Hakuæ-Bażowska A, Krejszeff S, Kujawa R, Kupren K, et al. 2008.** Comparing the effectiveness of Ovopel, Ovaprim and LH–RH analogue used in the controlled reproduction of ide, *Leuciscus idus* (L). *Arch Polish Fisheries* 16: 363-370. doi: 10.2478/s10086-008-0024-2
12. **[ICA] Instituto Colombiano Agropecuario. 2007.** Buenas prácticas en la producción acuícola: directrices sanitarias y de inocuidad para la producción acuícola destinada al consumo humano. Bogotá: Produmédios. 65 p. [Internet]. Disponible en: http://www.cib.-uaem.mx/pdf/buenas_practicas.pdf
13. **Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Guan G, Nagahama Y. 2008.** Sexual dimorphic expression of DMRT1 and Sox9a during gonadal differentiation and hormone-induced sex reversal in the teleost fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Dev Dynam* 237: 297-306. doi: 10.1002/dvdy.21409.
14. **Kucharczyk D, Kujawa R, Luczynski M, Glogowski J, Babiak I, Wyszomirska E. 1997.** Induced spawning in bream, *Abramis brama* (L), using carp pituitary extract and hCG. *Aquac Res* 28: 139-144. doi: 10.1046/j.1365-2109.1997.t01-1-00840.x
15. **Kucharczyk D, Kujawa R, Mamcarz A, Targońska-Dietrich K, Wyszomirska E, Glogowski J, Babiak I, Szabó T. 2005.** Induced spawning in bream (*Abramis brama* L) using pellets containing GnRH. *Czech J Anim Sci* 50: 89-95. doi: 10.17221/4000-CJAS
16. **Kucharczyk D, Nowosad J, Kujawa R, Dietrich G, Biegaj M, Sikora M, Luczynski MJ. 2017.** Comparison of spontaneous and hormone-induced reproduction of burbot (*Lota lota* L) under hatchery conditions. *Aquaculture* 485: 25-29. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.08.040
17. **Legac F, Blaise O, Fostier A, Lebail PY, Loir M, Mourot B, Weil C. 1993.** Growth Hormone (GH) and reproduction: a review. *Fish Physiol Biochem* 11: 219-232. doi: 10.1007/BF00004569
18. **Leino RL, Jensen KM, Ankley GT. 2005.** Gonadal histology and characteristic histopathology associated with endocrine disruption in the adult fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Phar* 19: 85-98. doi: 10.1016/j.etap.2004.05.010
19. **Lenis G, Restrepo L, Cruz-Casallas P. 2009.** Evaluación de tres protocolos de tratamiento hormonal sobre el diámetro de ovocitos de sabaleta *Brycon henni*. *Rev Colomb Cienc Pec* 22:131-142.
20. **Lenis GA, Cruz PE, David Ruales CA. 2015.** Reproducción inducida de la sabaleta *Brycon henni*: revisión bibliográfica. *Rev Lasallista Invest* 12: 211-220.
21. **Lubzens E, Bobe J, Young G, Sullivan CV. 2017.** Maternal investment in fish oocytes and eggs: The molecular cargo

- and its contribution to fertility and early development. *Aquaculture* 472: 107-143. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.10.029
22. **Lubzens E, Young G, Bobe J, Cerda J. 2010.** Oogenesis in teleosts: how eggs are formed. *Gen Comp Endocr* 165: 365-387. doi: 10.1016/j.ygcen.2009.05.022
 23. **Milla S, Jalabert B, Rime H, Prunet P, Bobe J. 2006.** Hydration of rainbow trout oocyte during meiotic maturation and *in vitro* regulation by 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one and cortisol. *J Exp Biol* 209: 1147-1156. doi: 10.1242/jeb.02094
 24. **Montoya-López A, Carrillo LM, Olivera-Ángel M. 2006.** Algunos aspectos biológicos y del manejo en cautiverio de la sabaleta *Brycon henni* Eigenmann, 1913 (Pisces Characidae). *Rev Colomb Cienc Pec* 19: 180-185.
 25. **Muller T, Baska F, Niklesz C, Horn P, Váradi B, Bercsényi M. 2005.** The testis histology of artificially matured European eel (*Anguilla anguilla* L) at the end of sexual maturation, and spermatozoa ultrastructure in freshwater rearing. *Acta Biol Hung* 56: 169-172. doi: 10.1556/ABiol.56.2005.1-2.17
 26. **Mukherjee D, Mukherjee D, Sen U, Paul S, Bhattacharyya SP. 2006.** *In vitro* effects of insulin-like growth factors and insulin on oocyte maturation and maturation-inducing steroid production in ovarian follicles of common carp, *Cyprinus carpio*. *Comp Biochem Physiol* 144: 63-77. doi: 10.1016/j.cbpa.2006.01.012
 27. **Pardo-Carrasco SC, Arias-Castellanos JA, Suárez-Mahecha H, Cruz-Casallas PE, Vásquez-Torres W, Atencio-García V, Zaniboni-Filho E. 2006.** Inducción a la maduración final y ovulación del Yamú *Brycon amazonicus* con EPC y mGnRH-a. *Rev Colomb Cienc Pec* 19: 160-166.
 28. **Peter RE, Lin HR, Van Der Kraak G. 1988.** Induced ovulation and spawning of cultured freshwater fish in China: advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonists. *Aquaculture* 74: 1-10. doi: 10.1016/0044-8486(88)90080-4
 29. **Pineda-Santis H, Arboleda L, Echeverry A, Urcuqui S, Pareja D, Olivera M, Builes J. 2007.** Caracterización de la diversidad genética en el pez *Brycon henni* (Characiformes: Characidae) en Colombia central por medio de marcadores RAPD. *Rev Biol Trop* 55: 1025-1035. doi: 10.15517/rbt.v55i3-4.5975
 30. **Targońska K, Kupren K, Kujawa R, Mamcarz A, Kaczkowski Z, Glogowski J, et al. 2015.** Artificial reproduction of different dace, *Leuciscus leuciscus* (L) populations as a method for biodiversity preservation. *Turk J Fish Aquat Sc* 15: 477-485. doi: 10.4194/1303-2712-v15_2_34
 31. **Urbatzka R, Rocha MJ, Roche E. 2011.** Regulation of ovarian development and function in teleost. In: *Hormones and reproduction of vertebrates*. Amsterdam: Elsevier. p 65-81
 32. **Zapata OL, Vanegas PR. 1993.** Aspectos importantes sobre la reproducción inducida y el metabolismo de las gónadas de la sabaleta *Brycon henni*. Tesis de Biólogo. Medellín, Colombia: Univ. de Antioquia. 67 p.