



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



FACTORES ENDÓGENOS ASOCIADOS AL  
CRECIMIENTO DEL OOCITO Y EL DESOVE DE  
*Sardinops sagax* (Jenyns, 1842) (Teleostei: Clupeidae)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORADO EN CIENCIAS  
MARINAS

PRESENTA

JOSÉ ANTONIO OCAMPO CERVANTES

LA PAZ, BAJA CALIFONRIA SUR

NOVIEMBRE DE 2008



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
*ACTA DE REVISION DE TESIS*

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 20 del mes de Noviembre del 2008 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

**“FACTORES ENDÓGENOS ASOCIADOS AL CRECIMIENTO DEL OOCITO Y EL DESOVE  
DE *Sardinops sagax* (Jenyns, 1842) (Teleostei: Clupeidae)”**

Presentada por el alumno:

**OCAMPO**

Apellido paterno

**CERVANTES**

materno

**JOSÉ ANTONIO**

nombre(s)

Con registro: 

A	0	4	0	2	6	1
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

**DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISION REVISORA**

Director de tesis  
PRIMER VOCAL

  
DRA. ROSA ISABEL OCHOA BÁEZ

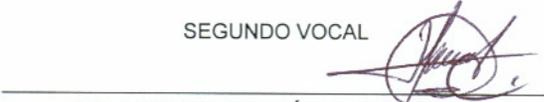
PRESIDENTE

  
DR. JOSÉ LUIS CASTRO AGUIRRE

SECRETARIO

  
DR. MARCIAL ARELLANO MARTÍNEZ

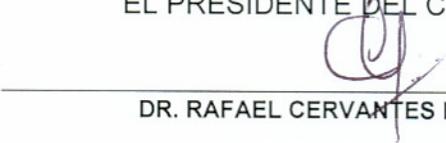
SEGUNDO VOCAL

  
DR. GUSTAVO HERNÁNDEZ CARMONA

TERCER VOCAL

  
DR. ILIE SAVA RACOTTA DIMITROV

**EL PRESIDENTE DEL COLÉGIO**

  
DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE



**IPN  
CICIMAR  
DIRECCIÓN**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 18 del mes Noviembre del año 2008, el (la) que suscribe JOSÉ ANTONIO OCAMPO CERVANTES alumno(a) del Programa de DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS con número de registro A040259 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo al dirección de: DRA. ROSA ISABEL OCHOA BÁEZ y cede los derechos del trabajo titulado: "FACTORES ENDÓGENOS ASOCIADOS AL CRECIMIENTO DEL OOCITO Y EL DESOVE DE *Sardinops sagax* (Jenyns, 1842) (Teleostei: Clupeidae)" al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: jocampo@ipn.mx rochoa@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

MC. JOSÉ ANTONIO OCAMPO CERVANTES

*nombre y firma*

Each level [of complexity] finds its explanations of mechanism in the levels below, and its  
significance in the levels above.

Professor George A Bartholomew (1919-2006).  
Department of Ecology and Evolutionary Biology  
UCLA.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo y la obtención del Grado de Doctorado en Ciencias Marinas son la suma de la participación de diferentes personas e Instituciones que de alguna u otra forma aportaron algo para poder llevar a fin la idea de asomarse un poco al complejo proceso que es la reproducción de una especie tan estudiada y de la que aún falta mucho por conocer.

En primer lugar quiero agradecer al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas la oportunidad de realizar mis estudios de Doctorado en el programa de Doctorado en Ciencias Marinas.

Debo agradecer también a las instancias que aportaron el apoyo económico durante estos años de estudio: al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo brindado a través de la beca otorgada y al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) del Instituto Politécnico Nacional.

La obtención de muestras y su procesamiento se realizó a través de los proyectos que se desarrollaron durante estos años en el Laboratorio de Morfofisiología y que estuvieron a cargo del Dr. J. René Torres Villegas y la Dra. Rosa Isabel Ochoa Báez:

- Actividad reproductiva y producción de oocitos de la sardina monterrey en Bahía Magdalena, B.C.S. CGPI 20020345
- Indicadores ambientales de abundancia de la sardina monterrey *Sardinops caeruleus* en el Noroeste de México. SIMAC20020107001 y SIP 20050632
- Gestión racional del recurso sardina en la costa occidental de la península de Baja California. SAGARPA-CONAPESCA.
- Temporada de desove, producción de oocitos y la incidencia de atresia en la población desovante de la sardina monterrey en Bahía Magdalena, B.C.S., México.

Quiero hacer un agradecimiento particular al Dr. J. René Torres Villegas y la Dra. Rosa Isabel Ochoa Báez por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo que es la continuación de un esfuerzo de más de 25 años en el estudio de la reproducción de la sardina monterrey, por su tiempo dedicado en mi formación como investigador y por compartir sus conocimientos sobre un tema que pocos quieren abordar: la histología. Gracias por su paciencia y su apoyo durante estos años.

Mi agradecimiento también por el tiempo dedicado a quienes participaron en la revisión de este manuscrito: Dra. Rosa Isabel Ochoa Báez, Dr. José Luis Castro Aguirre, Dr. Gustavo Hernández Carmona, Dr. Marcial Arellano Martínez y al Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov por las sugerencias y comentarios.

Tengo que hacer un agradecimiento muy especial a la Q.B.P. Ana María Ramírez Ornelas por su apoyo en el análisis de las muestras de suero de sardina, por los descuentos y los créditos en el pago de los análisis.

A la M. en C. Martha Quiroga Ramírez, jefa del Laboratorio de Hematología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN y a la Dra. Alejandra Martínez Guzmán debo de

agradecer el compartir su tiempo y conocimientos sobre la hematología de peces, que me ayudaron a completar parte de este trabajo y me dieron nuevas ideas para continuar utilizando la hematología como herramienta para futuras investigaciones.

A la Dra. Adriana Becerril, Dra. Adriana Jaramillo y Dr. Rafael Campos Rodríguez quiero agradecer su asesoría en la estancia de investigación de inmunocitoquímica realizada en la Escuela Superior de Medicina del IPN.

Parte importante de este trabajo fue el apoyo que otorgaron las empresas sardineras que operan en Puerto San Carlos. Agradezco a la empresa empacadora Conservera San Carlos del Grupo Pando y a las flotas de los Navíos Pesqueros PM3 y Géminis por permitirnos ocupar sus cocinas como improvisados laboratorios.

Al Biol. David González Pantaleón, Director del Centro de Estudios Tecnológicos del Mar de Puerto San Carlos, B.C.S., quiero agradecer las facilidades otorgadas al permitirnos hacer uso de sus instalaciones para el procesamiento de las muestras al momento del desembarque.

A mi soporte, asistente y brazo derecho en el difícil trabajo de campo. Al Sr. Efraín Flores Montaña que aguanto desvelos, mareos y las “saludables” comidas de los sardineros. Muchas gracias Payin.

Finalmente, y no por eso menos importante, quiero agradecer a todas aquellas personas que me brindaron su apoyo moral. Gracias a mis hermanos y a mi madre por las llamadas y los “apurate ya a terminar esa tesis”. En la enfermedad, la cárcel y la escritura de una tesis doctoral se conocen a los amigos: gracias a Vanessa, Sylviane, Mario, Martha, Regio, Marianita y Alma por hacer los momentos mas agradables. Y por los consejos, producto de los años de experiencia, agradezco su tiempo para escucharme a mi amiga Liduvina Perezgómez y al M. en C. Marcial Villarejo Fuerte.

Al Rayo de Sol que ha iluminado mi vida. En la distancia lo llevo siempre conmigo.

## INDICE

<b>Relación de tablas y figuras</b>	I
<b>Glosario</b>	VI
<b>Resumen</b>	X
<b>Abstract</b>	XI
<b>Introducción</b>	1
<b>Antecedentes</b>	6
<b>Justificación</b>	15
<b>Hipotesis</b>	16
<b>Objetivos</b>	16
<b>Material y Métodos</b>	17
Obtención, selección y procesamiento de material biológico.	17
Determinación de los estadios de madurez gonádica.	21
Determinación de estradiol y calcio en suero sanguíneo.	23
Parámetros hematológicos.	24
Hematocrito	24
Caracterización de las células sanguíneas y conteos diferenciales en extensiones sanguíneas	24
Métodos estadísticos.	25
<b>Resultados.</b>	
<b>1 Características de la población muestreada.</b>	27
1.1. Distribución de frecuencia de tallas	27
1.2. Relación peso-longitud.	28
1.3. Factor de condición.	34
1.4. Proporción de sexos	35
1.5. Índice gonadosomático.	37
1.6. Relación del índice gonadosomático y el factor de condición.	39
<b>2 Caracterización morfológica del desarrollo de los oocitos.</b>	40
2.1. Crecimiento primario.	40
2.2. Crecimiento secundario.	41
2.3. Maduración.	49
2.4. Atresia folicular.	53
2.5. Folículos postovulatorios	55
<b>3 Incidencia de los estadios de desarrollo más avanzados</b>	57

<b>4 Cuantificación de estradiol y calcio en suero sanguíneo.</b>	62
4.1. Niveles de estradiol en suero sanguíneo	62
4.1.1. Niveles de estradiol asociado a los estadios de desarrollo del oocito	64
4.1.2. Variaciones de los niveles de estradiol asociados al ciclo circadiano	68
4.2. Niveles de calcio en suero sanguíneo	70
4.2.1 Niveles de calcio asociado a los estadios de desarrollo del oocito	71
4.2.2 Variaciones de los niveles de estradiol asociados al ciclo circadiano	75
4.3 Relación de los niveles de estradiol y calcio en suero sanguíneo	77
<b>5 Parámetros hematológicos.</b>	83
5.1. Hematocrito.	83
5.2. Hematocrito asociado a los estadios de desarrollo del oocito	85
5.3. Caracterización de las células sanguíneas	87
5.3.1. Serie roja	87
5.3.2 Serie blanca	88
5.4. Conteos diferenciales de leucocitos.	94
5.5. Factor de condición asociado a parámetros hematológicos	94
5.4.1. Relación del factor de condición y hematocrito	94
5.4.2. Relación del factor de condición y conteos de leucocitos.	95
<b>6 Variaciones de los indicadores durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.</b>	96
<b>Discusión.</b>	98
<b>Conclusiones.</b>	112
<b>Recomendaciones</b>	114
<b>Referencias bibliográficas.</b>	115

## RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS

### TABLAS

Tabla 1. Indicadores morfológicos propuestos por Hamers (1995) y Rough (2005) en dos especies diferentes de peces teleósteos.	26
Tabla 2. Relación de los lances de pesca comercial obtenidos durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006 en Bahía Magdalena, Baja California Sur.	27
Tabla 3. Resumen del análisis de varianza de la longitud patrón (LP) durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.	31
Tabla 4. Resumen del análisis de varianza de la longitud patrón (LP) durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.	32
Tabla 5. Parámetros de la regresión peso-longitud de los muestreos mensuales de las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.	33
Tabla 6. Parámetros de la regresión peso-longitud en machos (A) y hembras (B) de las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.	34
Tabla 7. Proporción de sexos de <i>S. sagax</i> durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.	36
Tabla 8. Resumen del análisis de varianza del IGS en hembras (IGSH) y en machos (IGSM) durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.	37
Tabla 9. Parámetros de la correlación entre el IGS y FC por sexos para las diferentes temporadas reproductivas.	39
Tabla 10. Relación de los lances de pesca comercial obtenidos durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006	62
Tabla 11. Resumen del análisis de varianza de los niveles de $E_2$ durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.	63
Tabla 12. Resumen del análisis de varianza de los niveles de $E_2$ asociado a los diferentes estadios de desarrollo de los oocitos.	68
Tabla 13. Resumen del análisis de varianza de los niveles de $Ca^{2+}$ durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.	70
Tabla 14. Resumen del análisis de varianza de los niveles de $Ca^{2+}$ asociado a los diferentes estadios de desarrollo de los oocitos	74
Tabla 15. Concentraciones de estradiol y calcio en suero sanguíneo por estadio de desarrollo del oocito.	77
Tabla 16. Parámetros de la correlación de $E_2$ - $Ca^{2+}$ agrupados por mes de muestreo de las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.	79
Tabla 17. Parámetros de la correlación de $E_2$ - $Ca^{2+}$ agrupados por fracción de día en un ciclo de 24 horas.	81

Tabla 18. Parámetros de la correlación de $E_2$ - $Ca^{2+}$ agrupados por intervalos de tallas.	82
Tabla 19. Resumen del análisis de varianza de los valores de hematocrito durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.	83
Tabla 20. Resumen del análisis de varianza de los valores de hematocrito asociados al ciclo circadiano	84
Tabla 21. Parámetros de la correlación del hematocrito vs. longitud patrón en las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.	84
Tabla 22. Resumen del análisis de varianza de los valores de hematocrito asociado a los diferentes estadios de desarrollo de los oocitos.	87
Tabla 23. Principales características morfológicas de las células sanguíneas de <i>S. sagax</i> .	93
Tabla 24. Parámetros de la correlación de Hc-FC agrupados por mes de muestreo de las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.	95

## FIGURAS

Figura 1. Esquema del control de la reproducción en los peces teleósteos.	9
Figura 2. Principales hormonas que intervienen en el crecimiento y maduración gonádica en machos y hembras de salmones.	12
Figura 3. Área de estudio.	17
Figura 4. Distribución de frecuencia de tallas de la captura comercial de <i>S. sagax</i> durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006	29
Figura 5. Distribución de frecuencia de tallas por sexos de la captura comercial de <i>S. sagax</i> durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.	30
Figura 6. Longitud patrón promedio mensual para las temporadas reproductivas de 2003 al 2006.	31
Figura 7. Peso total promedio mensual para las temporadas reproductivas de 2003 al 2006.	32
Figura 8. Variaciones del factor de condición de <i>S. sagax</i> durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.	35
Figura 9. Variaciones del índice gonadosomático de <i>S. sagax</i> durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.	38
Figura 10. Microfotografía de ovario de <i>S. sagax</i> . Se observan oogonias (Og) en diferentes etapas de desarrollo.	40

Figura 11. Microfotografía de oocitos en estadio perinúcleolar.	41
Figura 12. Microfotografía de oocitos en estadio de alvéolos corticales.	43
Figura 13. Microfotografía de oocitos en estadio de inclusiones lipídicas.	44
Figura 14. Microfotografía de oocitos en vitelogénesis inicial.	46
Figura 15. Microfotografía de oocitos en estadio de vitelogénesis avanzada.	47
Figura 16. Microfotografía de oocitos en estadio de células de la granulosa columnares.	48
Figura 17. Microfotografía de oocito en estadio de células de la granulosa columnares	49
Figura 18. Microfotografía de oocitos en estadio de proteólisis.	50
Figura 19. Microfotografía de oocito en estadio de núcleo migratorio.	51
Figura 20. Microfotografía de oocitos en hidratación inicial.	52
Figura 21. A) Detalle de oocito en hidratación inicial con los gránulos de vitelo fragmentados. B) Oocitos en hidratación avanzada.	53
Figura 22. Microfotografía de oocitos en atresia.	55
Figura 23. Microfotografías de diferentes etapas de folículos postovulatorios.	56
Figura 24. Frecuencia de hembras en los diferentes estadios de desarrollo del oocito para la temporada reproductiva de 2003	58
Figura 25. Frecuencia de hembras en los diferentes estadios de desarrollo del oocito para la temporada reproductiva de 2004	59
Figura 26. Frecuencia de hembras en los diferentes estadios de desarrollo del oocito para la temporada reproductiva de 2005	60
Figura 27. Frecuencia de hembras en los diferentes estadios de desarrollo del oocito en febrero de 2006.	61
Figura 29. Valores promedio en las concentraciones de estradiol en suero sanguíneo durante las diferentes temporadas reproductivas.	67
Figura 28. Valores promedio en las concentraciones de estradiol en suero sanguíneo durante las diferentes temporadas reproductivas	63
Figura 29. Variaciones en las concentraciones de estradiol por estadios de desarrollo del oocito en las diferentes temporadas reproductivas	66
Figura 30. Valores promedio de estradiol en suero sanguíneo asociado a los diferentes estadios de desarrollo del oocito	68

Figura 31. Variaciones en la concentración de estradiol asociado a los diferentes estadios de desarrollo del oocito y a la hora de captura de los ejemplares.	69
Figura 32. Valores promedio en las concentraciones de calcio en suero sanguíneo durante las diferentes temporadas reproductivas.	71
Figura 33. Variaciones en las concentraciones de calcio por estadios de desarrollo del oocito en las diferentes temporadas reproductivas	73
Figura 34. Valores promedio de calcio en suero sanguíneo asociado a los diferentes estadios de desarrollo del oocito.	74
Figura 35. Variaciones en la concentración de estradiol en suero sanguíneo, asociado a los diferentes estadios de desarrollo del oocito y a la hora de captura de los ejemplares.	76
Figura 36. Gráfica de dispersión de la correlación entre los niveles de estradiol y calcio en suero sanguíneo.	78
Figura 37. Distribución de frecuencia de hembras por concentraciones de estradiol y calcio en suero sanguíneo.	78
Figura 38. Gráfica de dispersión de la correlación entre los niveles de estradiol y calcio, agrupados por mes de muestreo	80
Figura 39. Gráfica de dispersión de la correlación entre los niveles de estradiol y calcio agrupados por fracción de día en un ciclo de 24 horas.	81
Figura 40. Gráfica de dispersión de la correlación entre los niveles de estradiol y calcio en suero sanguíneo	82
Figura 41. Variaciones del hematocrito de <i>S. sagax</i> durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.	83
Figura 42. Variaciones del hematocrito de <i>S. sagax</i> por fracción de día. Se presenta el valor promedio, el error y la desviación estándar.	84
Figura 43. Diagrama de dispersión de los valores del hematocrito en relación a la longitud patrón de <i>S. sagax</i> .	85
Figura 44. Variaciones del hematocrito asociado a los diferentes estadios de desarrollo del oocito para las diferentes temporadas reproductivas	86
Figura 45. Valores promedio del hematocrito asociado a los diferentes estadios de desarrollo del oocito.	87
Figura 46. Micrografía de extensión sanguínea de <i>S. sagax</i> . Se observan los eritrocitos maduros (ec), eritrocitos policromatófilos (ep) y linfocitos (lf).	88
Figura 47. Micrografía de extensión sanguínea de <i>S. sagax</i> . Se observan linfocitos de diferentes tamaños (lf) y el halo de citoplasma	89

(\*), eritrocitos (ec) y eritrocitos policromatófilos (ep).

Figura 48. Micrografía de extensión sanguínea de <i>S. sagax</i> . Se observan diferentes etapas de madurez de granulocitos neutrófilos	90
Figura 49. Micrografía de extensión sanguínea de <i>S. sagax</i> . Se observan granulocitos eosinófilo (ge) de diferentes tamaños	91
Figura 50. Micrografía de extensión sanguínea de <i>S. sagax</i> . Se observa un granulocito basófilo (gb), eritrocitos (ec) y eritrocitos policromatófilos (ep).	91
Figura 51. Micrografía de extensión sanguínea de <i>S. sagax</i> . A) Se observan monocitos (mc) con vacuolas. B) Monocito con núcleo en forma de riñón y cromatina más compacta (mc).	92
Figura 53. Frecuencia de los diferentes tipos de leucocitos en los conteos diferenciales.	94
Figura 54. Diagrama de dispersión del factor de condición (FC) y hematocrito (Hc) durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006	95
Figura 55. Frecuencia de conteos diferenciales de leucocitos en la temporada reproductiva de 2005 y 2006	96
Figura 56. Variaciones de los indicadores morfofisiológicos asociados a la madurez gonádica de <i>S. sagax</i> durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.	97

## GLOSARIO

**Acidófilo:** afinidad de los compuestos de un tejido para captar colorantes ácidos. En la tinción Hematoxilina-Eosina son afines a la eosina, por lo que también se les conoce como eosinófilos. Adquieren una coloración de rosa a rojo (Ham 1975).

**Alveolo cortical:** estructura citoplasmática, sintetizada por el oocito y compuesta principalmente por polisialoglicoproteínas de alto peso molecular. Estas estructuras liberan su contenido al momento de la fertilización, originando la reacción cortical y evitando la poliespermia (Tyler y Sumpter 1996).

**Atresia:** proceso mediante el cual se reabsorben los gametos no desovados. En los oocitos, las células foliculares adquieren propiedades fagocitarias, reabsorbiendo el contenido del oocito (Rodríguez-Gutierrez, 1992; Tyler y Sumpter 1996).

**Basófilo:** afinidad de los compuestos de un tejido para captar colorantes básicos. En la tinción Hematoxilina-Eosina son afines a la hematoxilina y adquieren una coloración azul o púrpura (Ham 1975).

**Desovador asincrónico:** organismo en el cual los huevos son reclutados de una población heterogénea de oocitos en desarrollo y son desovados subsecuentemente durante cada temporada de desove (Tyler y Sumpter 1996).

**Eritrocitos:** células nucleadas de la sangre, pertenecientes a la serie roja, encargadas del transporte de oxígeno a los diferentes órganos y tejidos del organismo, con pigmentación originada por la hemoglobina (Fänge, 1992).

**Eritropoyesis:** termino que se refiere a la formación de las células sanguíneas rojas o eritrocitos y que en los peces ocurre principalmente en el baso (Fänge, 1992).

**Folículo:** tejido somático que rodea al oocito, compuesto principalmente por las células de la granulosa y de la teca (Tyler y Sumpter 1996).

**Gónada:** órganos sexuales primarios en los cuales se producen las células germinales (Webster y Webster 1974).

**Granulosa,** células de la: células de origen mesenquimal o epitelial, con posible función esteroideogénica (Nagahama 1983).

**Granulocitos:** conjunto de células sanguíneas de la serie blanca, que presentan como característica principal la presencia de gránulos en el citoplasma y de acuerdo a su afinidad a diferentes colorantes permite dividirlos en eosinófilas, basófilas o neutrófilas (Fänge, 1992).

**Hematocrito:** método utilizado para estimar la proporción del paquete celular en la sangre (Fänge, 1992).

**Hematopoyesis:** término que se refiere a la generación de los diferentes tipos de células blancas y que ocurre en el tejido hematopoyético (Fänge, 1992).

**Inclusión lipídica:** cuerpo de lípidos originado durante el crecimiento secundario del oocito, derivado de la vitelogenina, y que posteriormente forma la gota de lípido en algunas especies de teleósteos con huevos pelágicos (Tyler y Sumpter 1996)

**Linfocitos:** células de la serie blanca o leucocitos que tienen como función principal la de activar la respuesta humoral y la respuesta celular inmune en procesos infecciosos (Fänge, 1992).

**Leucocitos:** término colectivo de las células de la sangre que tienen como función primaria combatir infecciones y en algunos casos fagocitar cuerpo extraños al organismo (Fänge, 1992).

**Membrana basal:** red de tejido conectivo, generalmente muy delgado, que soporta un epitelio (Webster y Webster 1974).

**Oocito:** célula germinal, constituida por ooplasma rodeado por el oolema, la zona radiata, el folículo y tejido somático (Tyler y Sumpter 1996).

**Oolema:** membrana celular del oocito (Balinski 1978).

**Oogonias:** células germinales primarias situadas en el epitelio germinal del ovario (Grier, 2002).

**Ooplasma:** matriz citoplasmática en la cual se encuentran todas las inclusiones que se desarrollan durante el proceso de maduración del oocito (Balinski 1978).

**Oogénesis:** Proliferación de células germinales femeninas a partir de la división mitótica de las oogonias (Nagahama 1983).

**Paquete celular:** proporción de células sanguíneas en relación al suero o plasma sanguíneo (Fänce, 1992).

**Reacción cortical:** endurecimiento de la membrana del huevo, ya sea por acción de los alvéolos corticales o por reacción osmótica (Billard 1992).

**Sangre:** tejido compuesto de células circulantes en un medio líquido o plasma. Su función es el transporte de oxígeno, nutrientes y productos excretados de los diferentes órganos y tejidos del cuerpo (Fänce, 1992).

**Suero:** líquido remanente después de la coagulación de la sangre, el cual está libre de factores coagulantes (Fänce, 1992).

**Vitelo:** reservas del oocito formadas de lipoproteínas y fosfoproteínas, derivadas principalmente de la vitelogenina (Tyler y Sumpter 1996).

**Vitelogénesis:** periodo de crecimiento del oocito durante el cual las proteínas de origen extraovárico, principalmente la vitelogenina sintetizada en el hígado, son acumuladas en el oocito (Tyler y Sumpter 1996).

**Zona radiata:** membrana del oocito de apariencia estriada, compuesta de una capa interna y otra externa, y que se forma cuando las primeras inclusiones lipídicas aparecen en el citoplasma (Matsuyama et al. 1991).

## LISTA DE ABREVIATURAS.

En este trabajo se utilizó una serie de abreviaturas que fueron empleados a lo largo del texto y en las gráficas para hacer referencia al estadio de desarrollo mas avanzado en el ovario.

E <sub>2</sub>	Estradiol
Ca <sup>+2</sup>	Calcio
FC	Factor de condición
Hc	Hematocrito
IGS	Índice gonadosomático
LP	Longitud patrón
PT	Peso total
FPO	Folículos postovulatorios
pn	perinúcleolares
ac	alvéolos corticales
aca	alvéolos corticales en atresia
il	inclusiones lipídicas
ila	inclusiones lipídicas en atresia
vi	vitelogénesis inicial
vipo	vitelogénesis inicial y folículos postovulatorios
va	vitelogénesis avanzada
vapo	vitelogénesis avanzada y folículos postovulatorios
ca	células granulosas columnares
pl	proteólisis
nm	núcleo migratorio
hi	hidratación
at	atresia

## RESUMEN

Se hizo el seguimiento de la maduración gonádica en organismos silvestres de sardina monterrey *Sardinops sagax* durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006, en la zona de Bahía Magdalena, B.C.S., a bordo de la flota comercial sardinera de Puerto San Carlos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los factores endógenos como los niveles de estradiol ( $E_2$ ) y calcio ( $Ca^{2+}$ ) en suero sanguíneo, el hematocrito (Hc), índice gonadosomático (IGS) y el factor de condición (FC) y su relación con el crecimiento del oocito y el desove. Se utilizaron el hematocrito y los conteos diferenciales de leucocitos, asociados al factor de condición (FC), como indicadores del estado de bienestar de los organismos. Se recolectaron 2848 sardinias adultas, en campo se tomó una muestra de sangre a 20 ejemplares por cada lance de pesca. Se tomó la muestra para Hc y frotis sanguíneo y el suero se conservó para las determinaciones de  $E_2$  y  $Ca^{2+}$ . Se fijaron los ejemplares en formalina y en el laboratorio se registraron la longitud patrón, peso total y peso de la gónada. Las muestras de gónadas fueron fijadas y procesadas por la técnica de inclusión en parafina para su análisis histológico. Los estadios de desarrollo de los oocitos se asignaron siguiendo las escalas propuestas para otras especies de peces teleósteos. Se seleccionaron 156 hembras en las que se determinó la relación entre los factores endógenos y el crecimiento del oocito y el desove. Se encontró que el  $E_2$ ,  $Ca^{2+}$  e IGS presentaron relación directa asociada al crecimiento del oocito, mientras que el Hc presentó relación inversa. La presencia de hembras de *S. sagax* con atresia folicular en dos temporadas reproductivas, permitieron hacer comparaciones de los factores endógenos estudiados entre hembras en desarrollo ovárico normal y con atresia folicular masiva. En 2003 y 2005 las hembras con atresias se presentaron en los meses considerados de actividad reproductiva. En 2003 se observó inactividad ovárica con atresia folicular en oocitos perinucleolares, en 2005 se observó reabsorción con atresia folicular masiva de oocitos en vitelogénesis. Los niveles de  $E_2$  y  $Ca^{2+}$  en las hembras con atresia presentaron valores bajos similares a los obtenidos para hembras inmaduras, al igual que el Hc, IGS y el FC. Se concluye que los factores endógenos asociados al crecimiento del oocito y el desove de *S. sagax*, determinados por primera vez en esta especie, pueden ser utilizados como indicadores del proceso de madurez ovárica, permitiendo establecer las condiciones en las cuales se presenta la interrupción de la madurez gonádica y sus posibles efectos en la reproducción de *S. sagax*.

## ABSTRACT

Gonadal activity of Pacific sardine *Sardinops sagax* was followed during the breeding seasons at Bahía Magdalena, Baja California Sur., from 2003 to 2006. Collections of adult Pacific sardines were taken from catches of commercial vessels of Puerto San Carlos. Main goal was evaluate endogenous factors as estradiol ( $E_2$ ) and calcium ( $Ca^{2+}$ ) serum levels, haematocrit (Hc), gonadosomatic index (GSI), and condition factor (FC) and their relation with the oocyte development and spawning. Haematology parameters such as haematocrit and leucocytes differential counting (Hc), was associated to condition factor (FC), as indicators of organisms welfare. A total of 2848 adult sardines were collected trough the sample period. Blood samples were collected from 20 specimens each fishing set, and Hc and blood smears were made at the field work. Remained blood sample was preserved for measurements of  $E_2$  and  $Ca^{2+}$  serum levels. Complete fish were fixed in formalin and morphological measurements data as standard length, total and gonadic weights were taken at laboratory. Gonads were included and processed by wax inclusion for histological process. Oocyte development stages were set following proposed scales for other teleost species. A total of 156 females were selected to determinate the relation between endogenous factors and oocyte growth and spawning.  $E_2$ ,  $Ca^{2+}$  and IGS were directly related to oocyte development, whereas Hc was inversely related. Presence of females with atretic follicles in two reproductive seasons has allowed comparisons of endogenous factors measurements in females with a normal ovaries development and females with atretic follicles. During 2003 and 2005 females with atretic follicles were present in considered reproductive months. In 2003 ovaric inactivity were observed with atretic follicles on perinuclear oocytes stage, while in 2005 reabsortion there were massive atretic follicles at vitellogenic oocyte stage.  $E_2$  and  $Ca^{2+}$  levels in atretic follicles females showed low levels similar to immature females, as well as Hc, IGS and FC. In would be concluded that endogenous factors related to oocyte development and spawning in *S sagax* will be useful as indicators of ovarian growth allowing to establish those that are present at ovarian growth interruption and it possible effects on *S sagax* reproduction.

## INTRODUCCIÓN.

En la actualidad se conocen en gran medida los procesos que intervienen en la reproducción de los peces teleósteos. Los estudios que condujeron a ampliar los conocimientos de la reproducción en peces se han centrado en especies que representan un interés comercial o que se han adaptado al cautiverio (Baker *et al.*, 2000; Planas *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2001; Zohar y Mylonas, 2001). Así, los aportes realizados a través de la observación bajo condiciones controladas han demostrado la estrecha relación que existe entre los organismos y los factores que intervienen en la reproducción. La manipulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas en diversos estudios ha permitido determinar que procesos ocurren durante la maduración gonádica y el desove (King y Pankhurst, 2003; Sund y Pankhurst, 2004, García-López *et al.*, 2006).

Los trabajos relacionados con la biología reproductiva de diferentes especies se han realizado con miras al manejo de las poblaciones explotadas en la pesca industrial y a su producción en sistemas de cultivo y se ha considerado importante conocer la manera de controlar la reproducción en condiciones de laboratorio. En cultivos comerciales, los primeros aspectos de interés que se abordan son los mecanismos del desarrollo de las gónadas y su maduración. A través de ellos se han podido establecer los ciclos de madurez, como en el caso de *Pagellus bogaraveo*, en el cual se pudieron determinar tales aspectos y también algunas características de la reversión sexual en una especie que presenta hermafroditismo protándrico (transformación de machos en hembras) y que es explotada en cultivos comerciales (Micale *et al.*, 2002). En otras especies los estudios de biología reproductiva incluyen el seguimiento de los cambios hormonales y su efecto en la reproducción, o bien se manipularon dichos cambios mediante el uso de esteroides sexuales para estimular la reproducción. En *Acipenser transmontanus* (Lutes *et al.* 1987) y *Oncorhynchus kisutch* (Fitzpatrick *et al.* 1987), el seguimiento de los cambios hormonales se ha utilizado como predictor de la reproducción, al estimular la respuesta ovulatoria mediante el uso de esteroides sexuales, determinándose las concentraciones a las cuales estas especies logran la ovulación.

Si bien es cierto que la reproducción de los peces esta relacionada con la edad y la condición fisiológica del organismo (Carrillo *et al.*, 2000; Craig *et al.*, 2000; Izquierdo *et al.*, 2001), el proceso en general también depende de otros factores (Cerdeña *et al.*, 1994; Maisse y Breton, 1996; Haddy y Pankhurst, 2000; Furuita *et al.*, 2001). Estos factores pueden

dividirse en exógenos y endógenos. Los primeros incluyen factores tales como la temperatura, fotoperíodo, características físicas y químicas del agua (salinidad, oxígeno disuelto, pH, etc.), factores sociales como la desproporción de sexos, disponibilidad de alimento, etc. (Munro, 1990). Cada uno de estos factores tiene influencia sobre los factores endógenos, que son todos los cambios fisiológicos en el organismo, asociados a la acción de los factores exógenos.

El efecto que tienen los factores exógenos sobre la reproducción se ha documentado de manera amplia (Carrillo *et al.*, 1987; Zanuy *et al.*, 2001, Suquet *et al.*, 2005). Se considera que los factores ambientales más importantes son la temperatura y el fotoperíodo, sobre todo en las especies que tienen una temporalidad reproductiva marcada (Bye, 1990). Se sabe que estos dos factores tienen un papel importante en la gametogénesis: mientras que el fotoperíodo puede ser la señal que inicia el proceso de maduración, la temperatura es el factor que acelera la maduración del oocito y estimula el desove.

Otro factor importante en el proceso reproductivo es la alimentación; aun si las condiciones ambientales son óptimas para la reproducción si el organismo no cumple con los requerimientos metabólicos la maduración gonádica puede verse afectada. La reproducción utiliza la energía que ha sido obtenida y almacenada a partir de la alimentación, por lo que un organismo con deficiencias alimenticias no tiene suficientes reservas para la maduración. Se ha demostrado que en algunos peces pelágicos como *Engraulis mordax*, es necesario que el organismo consuma de un 4 a 5 % de su peso por día de alimento para sostener el costo anual de crecimiento y reproducción (Hunter y Leong, 1981).

En la mayoría de los vertebrados la actividad sexual esta restringida a períodos estacionales. Cuando se presentan los factores externos y los factores endógenos que estimulan la reproducción, se inician una serie de reacciones en el organismo en lo que se conoce como el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (Sumpter, 1990). Como respuesta inmediata a los factores externos, el ciclo hormonal se inicia con la producción de factores liberadores gonadotrópicos en el hipotálamo. Dichos factores activan la producción de hormonas gonadotrópicas en la hipófisis, estableciéndose un proceso de retroalimentación a través de la producción de los esteroides sexuales en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (Nagahama, 1994; Schulz *et al.*, 1994). En cada una de las etapas que implica el proceso reproductivo se presentan cambios fisiológicos y morfológicos en el organismo. En cultivos comerciales de *Mourone saxatilis*, *Oncorhynchus kisutch* y *Acipenser transmontanus*, se han utilizado

algunos cambios morfofisiológicos, principalmente los niveles hormonales y las características de los oocitos en desarrollo, como predictores de la ovulación (Fitzpatrick *et al.* 1987, Lutes *et al.* 1987, Weber *et al.* 2000). El uso de dichos predictores permitió identificar a los organismos susceptibles de ser inducidos al desove mediante implantes hormonales. Con esto se logró inducir la maduración en organismos que se encontraban en el proceso de vitelogénesis. Por otro lado, el seguimiento de los niveles de esteroides sexuales y de otros compuestos en la sangre, como las vitelogeninas, también son utilizados en el seguimiento de la madurez sexual (Marte y Lam, 1992; Mayer *et al.*, 1992; Schulz *et al.*, 1994).

Aun cuando los factores ambientales sean los adecuados para la reproducción, el proceso reproductivo podría verse interrumpido por los factores endógenos, los cuales se reflejan en cambios morfológicos de los órganos que participan en la reproducción (hipófisis y gónadas) y en los cambios hormonales. La utilización de indicadores morfofisiológicos puede ser una herramienta útil en la predicción del proceso reproductivo en organismos silvestres. En la sardina monterrey es bien conocido el papel de los factores ambientales en la reproducción, no así los factores endógenos que intervienen en esta (Lynn, 2003).

En la biología pesquera el estudio de la reproducción se ha enfocado en las relaciones del organismo y el ambiente, la temporalidad de la reproducción y a la elaboración de modelos que ayudan a estimar la dinámica de las poblaciones explotadas. En este sentido, la sardina monterrey *Sardinops sagax* ha sido objeto de amplio estudio. Los esfuerzos dirigidos a comprender las variaciones en sus poblaciones han incluido el estudio del efecto que tienen los factores ambientales y la pesca sobre su reproducción. El programa CalCOFI (California Cooperative Fisheries Investigations Program), se creó en 1948 en un esfuerzo por tratar de explicar el colapso de la pesquería de la sardina. A partir de esto se formularon diferentes hipótesis para explicar cuáles son los factores que afectan el reclutamiento y por ende las variaciones en el tamaño de la población.

Las hipótesis denso-dependientes señalan que las fluctuaciones de la población recaen en factores como la reproducción, el reclutamiento y la mortalidad natural (Kim *et al.*, 2006). Clark y Marrk (1955), presentaron una discusión en la propusieron que las clases anuales grandes provienen de grupos desovantes grandes, mientras que las clases anuales pequeñas pueden ser producto de un stock de cualquier tamaño. Sin embargo, no encontraron una relación clara entre el tamaño del stock y las clases anuales. Aún cuando

no llegaron a un acuerdo sobre la relación que existe entre el tamaño de una clase anual y el tamaño del grupo desovante que los produce, concluyeron que la respuesta a las variaciones recae directamente sobre la factibilidad del manejo del recurso. Por otro lado, Hempel (1979) menciona que la fecundidad, y por ende el reclutamiento, pueden verse afectados en especies en las cuales los organismos que se integran al grupo reproductivo producen una menor cantidad de huevos que los del siguiente grupo de edad. Por lo tanto, la producción de huevos estará en función de la estructura de edades y tallas de la población reproductiva. Entre otros factores que afectan la fecundidad señaló también el efecto de las condiciones alimenticias sobre el grupo reproductor y la producción de huevos.

Las fluctuaciones en la biomasa también se han tratado de explicar mediante otras hipótesis. Algunas de estas se basan principalmente en la vulnerabilidad de las larvas durante los primeros estadios de vida, tiempo durante el cual diversos factores pueden incrementar la mortalidad, afectando de esta manera el reclutamiento. Hjort (1914), sugiere que los primeros estadios larvales son el período más crítico durante el cual el tamaño de las clases anuales posteriores queda determinado. Hjort (*op. cit.*), sugirió además un efecto importante de dos factores en la tasa de mortalidad: la disponibilidad de alimento en la etapa larval y el transporte por corrientes hacia áreas desfavorables.

Hunter (1984) describió algunos de los factores que afectan la sobrevivencia de las larvas. Estos factores (tamaño y calidad del huevo, la relación entre tamaño de la boca y la presa, desarrollo de sistema locomotor, comportamiento alimenticio, etc.), inciden directamente en el éxito o fracaso que pueda tener la larva en la búsqueda de alimento en sus primeros estadios de vida, antes de llegar a la etapa de inanición. Bakun (1985), menciona que: la inanición y depredación de las larvas, el esfuerzo fisiológico, las enfermedades y los patrones de corrientes, son los factores principales que afectan la mortalidad de las larvas en sus primeros estadios de vida.

Las hipótesis propuestas para explicar las variaciones en el tamaño de las poblaciones de los pelágicos menores están basadas en resultados obtenidos de estudios que abarcan periodos de tiempo que pueden ser mensuales, anuales o de mayor escala. El efecto que tiene el ambiente sobre los organismos (temperatura, fotoperiodo y disponibilidad de alimento, señalados como los más importantes), han permitido asociar estos factores con variaciones o cambios en ciertas características de la población como la actividad reproductiva, la condición de los organismos y las fluctuaciones en la biomasa (Lluch-Belda

*et al.*, 1989; Lluch-Belda *et al.*, 1991; Lluch-Belda *et al.*, 1992; Yatsu *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006). Sin embargo, estos estudios muestran los cambios que ocurren en la población a largo plazo, desconociéndose cuales son los cambios que se dan en los organismos de forma más inmediata en respuesta a cambios mas puntuales en el ambiente.

En la costa occidental de Baja California Sur y el Golfo de California, Torres-Villegas *et al.* (1986, 1995a y 2007) han establecido las variaciones y el ciclo reproductivo de *Sardinops sagax* mediante el seguimiento de la madurez gonádica utilizando el método histológico, y se han determinado algunos parámetros como la fecundidad parcial, el ciclo diario de puesta y la incidencia de atresia mayor. Sin embargo, poco se conoce sobre los procesos fisiológicos que intervienen en la reproducción de *S. caeruleus*. Los trabajos más cercanos dentro del género *Sardinops* fueron realizados en *S. malanostictus* por Murayama *et al.* (1994) y Matsubara *et al.* (1995), quienes hicieron un seguimiento de los cambios en la madurez gonádica y los niveles de hormonas esteroides en plasma, relacionándolos con el desarrollo del oocito. El objetivo de ambos trabajos fue conocer los ciclos del desarrollo ovárico y los cambios hormonales que los acompañan, concluyendo que la información obtenida podría ser aplicada a las estimaciones de desoves potenciales reflejados en la fecundidad y los stocks de la especie.

Debido a la importancia de la sardina monterrey como un recurso pesquero y los esfuerzos realizados para tratar de explicar las variaciones en la abundancia del recurso, el objetivo de esta investigación fue relacionar el desarrollo ovárico asociado a los niveles de esteroides sexuales, y esto a su vez relacionarlo con indicadores fisiológicos que reflejen la condición gonádica del organismo. Las características de estos indicadores fisiológicos podrían proporcionar evidencias de cambios en el proceso de maduración gonádica, lo cual tendrá un efecto directo en la producción de oocitos y que a su vez afectará, de manera negativa o positiva, el tamaño de la población. Con esto podrían proponerse hipótesis alternas que ayuden a explicar las variaciones en el tamaño del stock, ya que como sugieren Murayama *et al.* (1994), la maduración y el desove son características biológicas importantes estrechamente relacionadas a los cambios endocrinológicos y su conocimiento debe de considerarse un prerrequisito en la valoración de las poblaciones sujetas a explotación.

## ANTECEDENTES

Los estudios relacionados con los factores que afectan a la reproducción de los peces marinos en el medio silvestre son escasos, particularmente aquellos que se refieren al control endocrino de la reproducción. En la última década los trabajos siguen documentándose principalmente en especies dulceacuícolas y algunas especies marinas utilizadas en cultivos comerciales (Marte y Lam, 1992). El objetivo principal de estos trabajos ha sido entender los mecanismos que controlan la reproducción, por lo que muchas de estas investigaciones se han realizado bajo condiciones de laboratorio, las cuales son dirigidas a estudiar el efecto de variables específicas y su importancia en la reproducción. Sin embargo, las condiciones controladas no pueden ser equivalentes a las condiciones silvestres, aunque en buena medida esto permite una comprensión aproximada de los procesos fisiológicos que controlan la reproducción y cómo los diferentes factores ambientales afectan dichos procesos.

Una de las principales líneas de investigación en la reproducción de los peces teleósteos es el estudio de la función de las gónadas y los ciclos reproductivos en diferentes especies (Bromage *et al.*, 2001). Se ha demostrado que las gónadas de los teleósteos presentan diferencias anatómicas entre especies, pero la estructura fundamental es básicamente la misma en cuanto a los elementos que constituyen el tejido gonádico. Además de la producción de gametos viables, las gónadas también presentan una función glandular al secretar hormonas esteroideas por el estímulo de las hormonas producidas en la hipófisis, y que en su conjunto regulan el crecimiento y desarrollo de las células germinales (Nagahama, 1983). La morfología del ovario puede presentar características propias en cada especie. Generalmente es un órgano par similar a un saco cerrado, constituido por tejido conjuntivo fibroso y el epitelio germinativo a partir del cual se diferencian las oogonias y los oocitos. Las células foliculares rodean a los oocitos y lo soportan en el estroma, acompañadas de vasos sanguíneos de menor calibre y terminaciones nerviosas.

De acuerdo a los diferentes patrones de desarrollo de los oocitos, los ovarios se han clasificado en tres tipos (Zanuy, 1987; DeVlaming 1982; Nagahama, 1983):

- Sincrónicos totales, en los que todos los oocitos se encuentran en el mismo estadio de desarrollo, característico de especies semélparas o que presentan un solo desove en su ciclo de vida.
- Sincrónicos por grupos, presentan al menos dos grupos de oocitos en diferentes estadios de desarrollo, propio de peces que presentan un periodo reproductivo corto.

- Asincrónicos, presentan varios grupos de oocitos en diferentes estadios de desarrollo, característico de especies que tienen desoves múltiples en la temporada de reproducción.

El proceso de maduración del ovario es concomitante con el desarrollo y crecimiento del oocito. Sin importar el tipo de desarrollo ovárico de la especie, los oocitos presentan procesos de desarrollo y crecimiento que son comunes en los teleósteos, tanto de especies marinas (Mayer et al, 1988; Kjesub et al, 1996; Rideout et al, 1999) como dulceacuícolas (Coward y Bromage, 1998). Tyler y Sumpter (1996) retomaron el trabajo de Wallace y Selman (1981) y modificaron el esquema establecido de la descripción del crecimiento del oocito.

Se ha considerado que los eventos más notables que suceden durante el crecimiento del oocito pueden ser clasificados en cuatro fases o periodos: crecimiento primario del oocito; estadio de alvéolos corticales, inclusiones lipídicas y vitelogénesis. Hicieron una descripción mas detallada de los cambios que ocurren durante el crecimiento del oocito y mencionan que los alvéolos corticales, que aparecen durante el crecimiento secundario, son las primeras estructuras citoplasmáticas que se pueden distinguir con el microscopio compuesto y que difieren de las vesículas de vitelo, además de que no son precursores de estas últimas. Los alvéolos corticales se componen de polisialoglicoproteínas, mientras que las vesículas de vitelo por glicolipofosfoproteínas (Tyler y Sumpter, 1996). Dichos autores consideraron dentro de la segunda fase de crecimiento a las inclusiones lipídicas, considerando su presencia como otro indicador del desarrollo del oocito y observaron que estos cuerpos de lípidos coinciden con la aparición de pigmentos carotenoides asociados a los componentes lipídicos de la vitelogenina (VTG), consideraron la posibilidad de que estos cuerpos de lípidos fueran derivados de las primeras moléculas de VTG sintetizadas por el hígado, que comienzan a acumularse en el oocito antes de darse una síntesis más activa de VTG que de inicio a la fase vitelogénica. Por último, consideraron a la vitelogénesis como el principal factor de crecimiento del oocito, debido a la acumulación de reservas en su interior. Sin embargo mencionan que en los peces marinos que liberan huevos pelágicos, la vitelogénesis no representa un incremento tan notable como el que es proporcionado por la hidratación.

Grier (2002) y Patiño y Sullivan (2002) discutieron sobre la inconsistencia que existe en la utilización de diferentes estadios del crecimiento folicular y del oocito, propusieron utilizar dichas terminologías para describir procesos fisiológicos y celulares más que estadios de desarrollo, los cuales pueden ser específicos para cada especie. Sin embargo, el uso de esta

terminología podría servir de referencia en cuanto a tratar de relacionar variaciones de los ciclos hormonales con los cambios morfológicos del oocito. Se ha reconocido que en los primeros estadios de desarrollo del oocito o previtelogénesis no hay una influencia hormonal, aunque algunos trabajos reportan la presencia de picos de gonadotrofinas hipofisarias en salmónidos (Prat *et al.*, 1985). Lo que si está bien establecido es que al inicio de la vitelogénesis las hormonas gonadotropas de la adenohipófisis estimulan la secreción de hormonas esteroides en los folículos ováricos. Se ha discutido sobre la posible presencia de dos tipos de hormonas gonadotrópicas en los teleósteos, de las cuales el tipo I (GtH-I) es responsable de estimular el crecimiento folicular y tendría una estructura similar a la LH, mientras que el tipo II (GtH-II) estaría implicada en el proceso de la vitelogénesis (van Oortd y Peute, 1983, Nagahama 1994).

Los procesos hormonales que intervienen en la maduración de los gametos son el resultado del estímulo de los factores ambientales que activan mecanismos endógenos e intervienen en el crecimiento y la maduración de las gónadas, el desove y la fertilización de los gametos (Barrell *et al.*, 2002). Los estímulos ambientales como la temperatura y el fotoperiodo son percibidos por el sistema nervioso, convertidos en señales eléctricas que a su vez son traducidas a señales hormonales, incidiendo sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (HHG) a través del sistema neuroendocrino. Una vez que los factores ambientales han desencadenado el proceso de desarrollo y maduración de las gónadas, se inicia con esto un ciclo hormonal que se mantiene mediante retroalimentación, ya sea de forma negativa o positiva, y controla todos los componentes del sistema, en el eje HHG que es el centro de control de la reproducción (Figura 1). Por lo tanto es importante conocer las relaciones que existen entre cada uno de estos órganos para establecer los puntos críticos en los cuales se puede ver interrumpido el proceso de la maduración gonádica.

Aunque no se incluye como parte del eje HHG, la glándula pineal también posee un papel fundamental en la reproducción. Esta glándula presente en todos los vertebrados, posee elementos sensoriales con función fotorreceptora. No ha sido bien establecido el papel de la glándula pineal en la reproducción de los peces. Algunas investigaciones han demostrado que la información relacionada con la reproducción es transmitida a diferentes centros en el cerebro, sincronizando el evento reproductivo con las condiciones más favorables para la supervivencia de las crías (Mayer *et al.*, 1997; Bromage *et al.*, 2001). La melatonina es la principal hormona producida por la glándula pineal y se encarga de regular diferentes funciones durante los ciclos estacionales y circadianos. Sin embargo, aún no está bien

establecido como se produce la interacción entre la reproducción y el crecimiento y los mecanismos de interacción entre la melatonina y el eje hipotálamo-hipófisis (Mazurais *et al.*, 1999). Existe una relación directa entre la producción de melatonina con el ciclo circadiano, el fotoperiodo y en menor medida con la temperatura (Max y Menaker, 1992; Porter *et al.*, 2001). Los niveles de melatonina en la sangre están relacionados con los periodos diarios de horas luz/oscuridad, que se incrementan durante la noche y decrecen en el día, traduciéndose estas variaciones en información que el organismo interpreta para establecer los cambios estacionales (Zanuy y Carrillo, 1987; Bromage *et al.*, 2001).

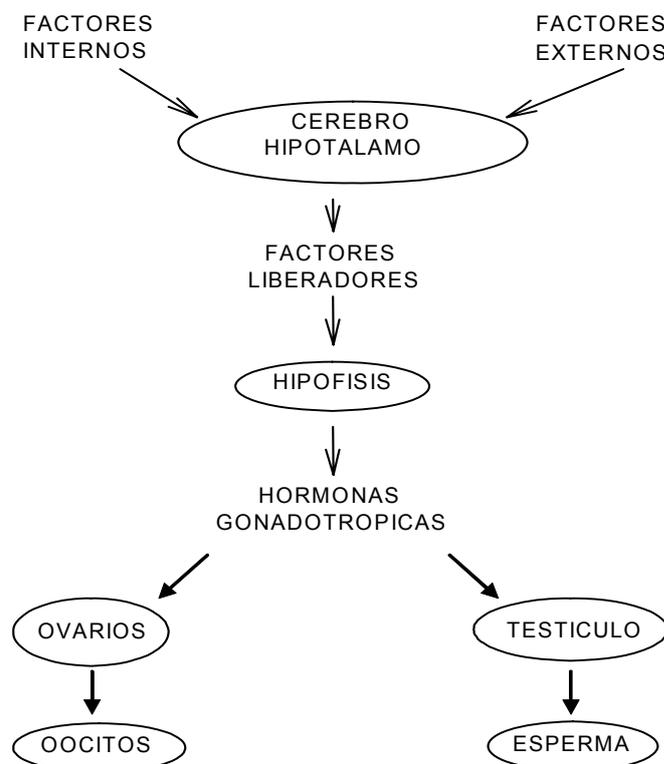


Figura 1. Esquema del control de la reproducción en los peces teleósteos. Este proceso es desencadenado por factores externos (temperatura, fotoperiodo, salinidad, etc.) que a su vez promoverán los factores internos (cortejo, liberación de feromonas, etc.), desembocando finalmente en la maduración de las gónadas y la liberación de los gametos sexuales (Zanuy y Carrillo 1993).

Los principales sitios receptores de melatonina se encuentran dispersos en el cerebro y concentrados en diferentes zonas como el tectum óptico, el tálamo y el cerebelo, los cuales se encargan del manejo de la información visual. En la hipófisis y las zonas cerebrales donde

se encuentran las neuronas productoras de GnRH los receptores de melatonina son escasos, por esto último, los mecanismos de acción no están bien identificados. Se cree que la interacción se lleva a cabo de manera indirecta a través de conexiones interneuronales entre las neuronas GABA (receptoras de neurotransmisores) y las células productoras de GnRH (Bromage et al., 2001).

Los grupos de células que conforman el hipotálamo responden a las señales generadas en el cerebro por los estímulos de la glándula pineal, mediante la liberación de mensajeros químicos conocidos como hormonas liberadoras. Los axones de las células hipotalámicas están en estrecha relación con la hipófisis y en su conjunto forman lo que se conoce como neurohipófisis, transmitiendo a su vez la información a la adenohipófisis.

Lafauire y Pauli (1972) demostraron que existen diferencias anatómicas de la hipófisis en diferentes especies de teleósteos y en ciertos casos entre juveniles y adultos de la misma especie, sin embargo, en todas las especies se conserva la estructura básica de la hipófisis. Como se mencionó con anterioridad, la hipófisis esta compuesta por la neurohipófisis y la adenohipófisis, y cumple diversas funciones en el sistema endocrino. Cada una de estas partes tienen orígenes embrionarios diferentes: la neurohipófisis se genera a partir de la invaginación del proceso ventral del diencefalo, mientras que la adenohipófisis se genera por una evaginación ectodérmica del techo de la cavidad bucal embrionaria. De estas dos secciones de la hipófisis, la adenohipófisis es la que interviene de forma directa en el eje HHG mediante la secreción de hormonas, y su estructura esta conformada por tres lóbulos: el lóbulo rostral o *pars distalis rostral* (PDR), el lóbulo caudal o *pars distalis proximal* (PDP) y el lóbulo intermedio o *pars intermedia* (PI) (Zanuy y Carrillo, 1987).

Dentro de los diferentes grupos de células que conforman la adenohipófisis, las células gonadotropas juegan un papel sumamente importante en el ciclo gonadal y por lo tanto en la reproducción. Estas células, de tipo basófilo, localizadas en la *pars distalis*, y presentan cambios morfológicos que están asociados al desarrollo gonadal (Borg et al., 1987). La secreción de las gonadotropinas (GtH) en la adenohipófisis, que es estimulada por las neurohormonas del hipotálamo (GnRH. y LHRH), establece un ciclo de retroalimentación con las gónadas y el hipotálamo. La secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y de la hormona liberadora de hormona leutinizante (LH-RH), tienen un efecto en la retroalimentación que se establece en el eje HHG durante el proceso reproductivo. Es

importante señalar que tanto la GnRH y la LHRH de los teleósteos parecen no presentar muchas diferencias en sus cadenas de péptidos, por lo que puede existir sobreposición de la actividad biológica de estas hormonas (Peter, 1983).

El proceso hormonal de la reproducción, tanto en hembras como en machos, inicia con la producción de hormonas liberadoras en el hipotálamo (GnRH y LHRH), que a su vez estimulan la producción de hormonas gonadotropas en la adenohipófisis. Estas hormonas tienen su blanco en las células somáticas de las gónadas que presentan función glandular y que producen hormonas esteroideas, ya sea estrógenos en el caso de las hembras o andrógenos en el caso de los machos. En el caso particular de las hembras se ha observado que hay un incremento en los niveles de testosterona circulante, anticipada al incremento en los niveles de estrógenos, o bien, estas dos hormonas pueden presentarse de manera simultánea durante la vitelogénesis (Mayer et al., 1992; Marte y Lam, 1992). Nagahama (1994) menciona que la presencia de testosterona se debe a que este es un precursor de los estrógenos, y que las células de la teca son las encargadas de producir este andrógeno, sintetizado a partir del colesterol en respuesta de las gonadotropinas. La testosterona es transportada a las células de la granulosa y por proceso de aromatización es transformada a  $17\beta$ -estradiol.

La síntesis de estrógenos en el folículo ovárico tiene un efecto directo en el hígado: el estradiol circulante promueve la síntesis de vitelogeninas en el tejido hepático, las cuales son vertidas al torrente sanguíneo y son incorporadas por micropinocitosis al interior del oocito. Cuando el oocito ha completado sus reservas vitelógenicas o ha alcanzado un tamaño que es particular para cada especie (Tyler y Sumpter, 1996), comienza el proceso de maduración. La súbita caída de los niveles de estrógeno circulante está asociada a una pérdida de la actividad aromatasa de la granulosa, y por consecuencia se rompe la retroalimentación negativa establecida entre los esteroides y la secreción de gonadotropinas (Zanuy y Carrillo, 1987). La presencia de hormonas inductoras de la maduración se da justo en el momento en que los niveles de gonadotropinas se incrementan al detenerse la síntesis de estradiol, y coinciden con el rompimiento de los gránulos de vitelo, de la migración de la vesícula germinal y del rompimiento de esta misma al terminar su migración. El proceso final es la ovulación, que es la acción mecánica que provoca el desprendimiento del oocito de las células foliculares que lo rodean, esta asociada a la presencia de ciertos tipos de progestinas, siendo la más común la  $17\alpha$ - $20\beta$ -dihidroxiprogesterona. El mecanismo para la

producción de esta hormona sería muy similar al de la síntesis de estradiol, pero en este caso las gonadotropinas se unirían a los receptores de la granulosa, activando el sistema adenil-ciclasa/AMPC, que promovería la síntesis de la  $20\beta$ -dihidroxiesteroideshidrogenas, y en presencia de esta enzima la  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona se transformaría en  $17\alpha$ - $20\beta$ -dihidroxiprogesterona (Nagahama, 1994).

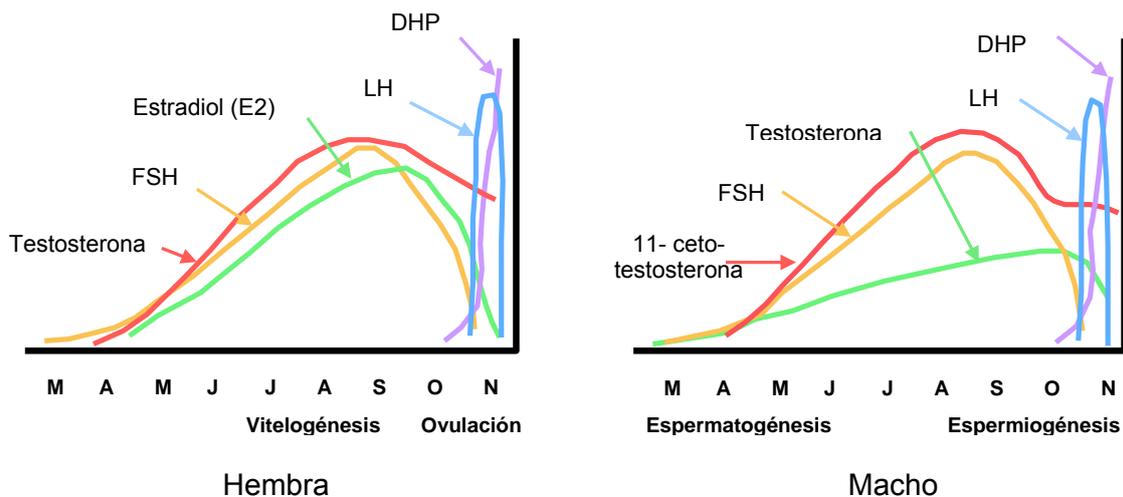


Figura 2. Principales hormonas que intervienen en el crecimiento y maduración gonádica en machos y hembras de salmones y su sucesión en los diferentes eventos gonádicos. FSH hormona foliculo estimulante; LH hormona luteinizante; DHP hormona desoxiprogesterona. Tomado y modificado de Sullivan (2003).

Mantener todo este mecanismo para lograr la reproducción demanda al organismo un gasto energético considerable. La reproducción de los peces, como en los demás vertebrados, esta limitada a un periodo del tiempo y un lugar definido en su ambiente, y a través de los procesos evolutivos los organismos se han adaptado a las condiciones que aseguraban el éxito reproductivo, en términos tanto del costo energético de los reproductores como de la supervivencia de la progenie (Bell, 1980). Identificar los periodos en los cuales los costos y las ganancias para la producción de nuevos organismos eran convenientes, llevó a una sincronización regulada por la periodicidad con que se presentaban dichas condiciones. La estacionalidad de la reproducción es más evidente en las zonas templadas o frías que en las zonas tropicales, se acompaña por una serie de eventos que influyen en ella tales como la maduración de las gónadas, migraciones, variaciones en la disponibilidad de alimento y crecimiento (Sumpter, 1990).

Esto mantiene al organismo en una relación muy estrecha con su ambiente, que funciona como un conjunto de sistemas a través de los cuales existe un flujo constante de materia y energía (Fry, 1971). El organismo, como un sistema abierto, mantiene el equilibrio interno mediante los procesos fisiológicos que regulan las entradas y salidas de energía y su capacidad de adaptarse al entorno. Por otro lado, el ambiente limita al organismo a través de los recursos y las condiciones necesarias para la existencia del mismo. Desde el punto de vista de la teoría de sistemas, cuando un sistema experimenta perturbaciones éste tenderá a manifestar fuerzas o cambios que tratan de contrarrestar la perturbación y regresar al estado estable, esto se interpreta en términos biológicos como la adaptación de los sistemas a nuevas situaciones, como una de las principales características de los sistemas abiertos: la auto-regulación (von Bertalanffy, 1950).

El organismo, las poblaciones o especies viven dependientes del ambiente, puesto que no pueden existir sin interactuar con el medio que les rodea (Nikolsky, 1963). La presión ejercida por el ambiente será la causa directa de los cambios en la fisiología de los organismos para asegurar su subsistencia, a través de procesos que pueden conllevar modificaciones en todas las escalas de organización del individuo, desde la respuesta enzimática a nivel celular como reacción inmediata a un estímulo ambiental, hasta las modificaciones genéticas en escalas de tiempo mayor. Esto tiene como objetivo final mantener constante el medio interno del organismo para minimizar los efectos del ambiente sobre sus funciones básicas, lo que le permite cierta independencia del ambiente.

Las ciencias pesqueras han tratado de establecer la relación y el efecto que el ambiente tiene sobre los organismos y se han desarrollado diferentes métodos para valorar dichas relaciones. El método más empleado es el factor de condición que proporciona una medida a *grosso modo* de la condición de salud o nutricional de los peces, asociando por lo general la variación de estos parámetros con los cambios ambientales o algunos procesos fisiológicos, principalmente la reproducción. Estudios realizados en especies como *Serranus scriba* (Zorica *et al.*, 2006) y *Mystus vittatus* (Hossain *et al.*, 2006) señalan una relación directa entre el cambio en el factor de condición y la maduración gonádica. Sin embargo, el factor de condición no puede mostrar cambios en la condición de los organismos en escalas de tiempo menores, ya que estos estudios se resumen a variaciones en escalas de tiempo mayores que pueden ser mensuales o anuales.

El estado de bienestar de los organismos en un periodo de tiempo más corto puede ser evaluado a través de otro tipo de indicadores fisiológicos, por ejemplo la proporción de células sanguíneas maduras/inmaduras puede verse influenciada por las condiciones fisiológicas y/o ambientales (Gallaugher y Farell, 1998). Se ha demostrado en especies como *Helostoma temmincki* (Weinberg *et al.*, 1976) y en *Oncorhynchus mikyss* (Lane, 1979) que la anemia inducida activa la eritropoyesis. Al igual que en los mamíferos, la eritropoyesis en los peces se activa cuando la relación entre la demanda de oxígeno y el oxígeno suministrado se incrementa. Esta relación puede verse afectada, entre otras causas, por el incremento de la temperatura que implica una mayor demanda de los peces en el consumo de oxígeno. Houston y Murad (1992) han demostrado que la maduración de los eritrocitos jóvenes de *Carassius auratus* se ve acelerada por el incremento de la temperatura. Algunos cambios estacionales como el fotoperíodo y la reproducción pueden influir en el proceso de eritropoyesis. Pottinger y Pickering (1987) observaron un incremento en la eritropoyesis que coincidió con el incremento en los niveles de andrógenos en plasma, principalmente 11-cetotestosterona en los machos de *Salmo trutta*.

El uso de indicadores morfofisiológicos ha sido implementado para conocer el estado o condición de organismos bajo condiciones de cultivo para manipular la reproducción. Los principales indicadores que se han utilizado en especies de cultivo como *Oncorhynchus kisutch* (Fitzpatrick *et al.* 1987) *Acipenser transmontanus* (Lutes *et al.*, 1987) y *Morone saxatilis* (Weber *et al.*, 2000) son los perfiles hormonales y los cambios morfológicos asociados al desarrollo del oocito. Estos indicadores podrían complementarse con el uso de otros índices utilizados en la evaluación del proceso reproductivo en poblaciones silvestres como el factor de condición y el índice gonadosomático, y en su conjunto proveer información complementaria que ayude a entender la dinámica de la reproducción en especies de importancia comercial.

Un ejemplo de esto podría ser la sardina monterrey *Sardinops sagax*, que es un recurso pesquero de importancia comercial el cual presenta grandes fluctuaciones en su biomasa y los volúmenes de captura. A partir de 1945 la captura de la sardina del Pacífico se colapsó, desarrollándose diferentes proyectos de investigación que trataron de explicar en términos pesqueros la drástica caída en los volúmenes de captura.

Trabajos realizados por MacGregor (1957), Macewicz et al. (1996) Butler et al. (1996), Torres-Villegas et al. (1995a, 1995b, 2007) en las poblaciones de adultos, proporcionan información sobre crecimiento, edad de primera madurez, ciclos de madurez gonádica, frecuencia de desove y fecundidad de la especie en el Pacífico Oriental. A pesar de los numerosos estudios pesqueros y de la biología reproductiva de *S. sagax*, es mínimo lo que se conoce en relación a los procesos fisiológicos o factores endógenos inherentes a la reproducción de la especie.

## **JUSTIFICACIÓN**

Desde hace 25 años se ha realizado el seguimiento de la reproducción de la sardina monterrey en la zona de Bahía Magdalena, B.C.S. (Torres-Villegas *et al.*, 1995a). Como resultado de estos trabajos se ha descrito el ciclo reproductivo de la especie a través de indicadores morfológicos de la madurez sexual, estimándose las tasas de producción de oocitos durante las temporadas de puesta. En otros estudios se ha hecho un seguimiento de los factores ambientales en la zona, tratando de establecer la relación de las variaciones del ambiente y la variación con la reproducción y el comportamiento de *Sardinops sagax* (Torres-Villegas, *et al.*, 1995b; Lluch-Belda *et al.*, 1991; Lynn, 2003; Yatsu *et al.*, 2005; Robinson *et al.*, 2007). Aunque se han hecho grandes esfuerzos por explicar y predecir la abundancia del recurso, en la actualidad aun no se esclarecen las causas de las grandes fluctuaciones de las poblaciones de los pelágicos menores en el mundo. Por este motivo, se hace indispensable encausar y realizar investigaciones sobre los mecanismos endógenos, relacionados con la reproducción de la especie.

La necesidad de conocer la fisiología de la reproducción de la sardina monterrey motivó el presente trabajo. Se buscó establecer valores de parámetros fisiológicos y sus variaciones durante la temporada reproductiva, para validar los indicadores fisiológicos de bienestar durante el desarrollo de los oocitos. El establecer indicadores morfofisiológicos precisos del mecanismo funcional de la maduración gonádica de *S. sagax* podría dar evidencias que hasta la fecha sólo existen en especies sometidas a cultivo. Esto permitiría proponer nuevas hipótesis sobre la reproducción de la especie, su relación con el ambiente y la relación de estos dos con las variaciones de la población. De manera adicional, complementarán la información, utilización y validación de índices como el gonadosomático y el factor de condición, que de forma tradicional se han empleado en biología pesquera sin un fundamento fisiológico que los sustente.

## **HIPOTESIS**

Puesto que se conoce la dinámica del ciclo ovárico de la sardina monterrey a escala microscópica y la temporalidad de la puesta, es posible asociar de manera directa las características morfológicas los diferentes estadios de desarrollo del oocito con los indicadores fisiológicos que intervienen en el proceso de maduración gonádica. De tal forma que las concentraciones de hormonas esteroides y los parámetros hematológicos permitirán establecer el estatus de las hembras durante el proceso de maduración gonádica y sus variaciones a lo largo de la temporada reproductiva.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar la relación entre los factores endógenos asociados al desarrollo del oocito a nivel celular y sus posibles variaciones durante cuatro temporadas reproductivas de la sardina monterrey *Sardinops sagax*.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Validar los cambios morfológicos del crecimiento y la maduración de los oocitos en la fase preovulatoria, así como la fase posovulatoria y la atresia durante la temporada reproductiva.
- Determinar los niveles de estradiol en suero sanguíneo en diferentes temporadas reproductivas.
- Determinar los niveles de calcio en suero sanguíneo en diferentes temporadas reproductivas.
- Asociar los niveles de estradiol y calcio con los cambios morfológicos de las gónadas durante la maduración sexual.
- Caracterizar la morfología de las células sanguíneas periféricas de la serie blanca y serie roja.
- Determinar las variaciones del hematocrito en relación con los diferentes estadios de desarrollo del oocito.
- Relacionar el factor de condición con el hematocrito y la presencia diferencial de leucocitos en la temporada reproductiva de *S.sagax*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### OBTENCIÓN, SELECCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

Para esta investigación se realizaron muestreos a bordo de la flota sardinera que opera en Puerto San Carlos, Baja California Sur en la zona de influencia de pesca que comprende las zonas de Bahía Magdalena, Bahía Almejas y Bahía de Santa María (Figura 3). Durante las temporadas reproductivas de los años 2003 al 2006 se hicieron campañas de muestreo mensuales de cinco días durante la fase de luna nueva, de diciembre a abril, con mayor énfasis durante febrero y marzo.

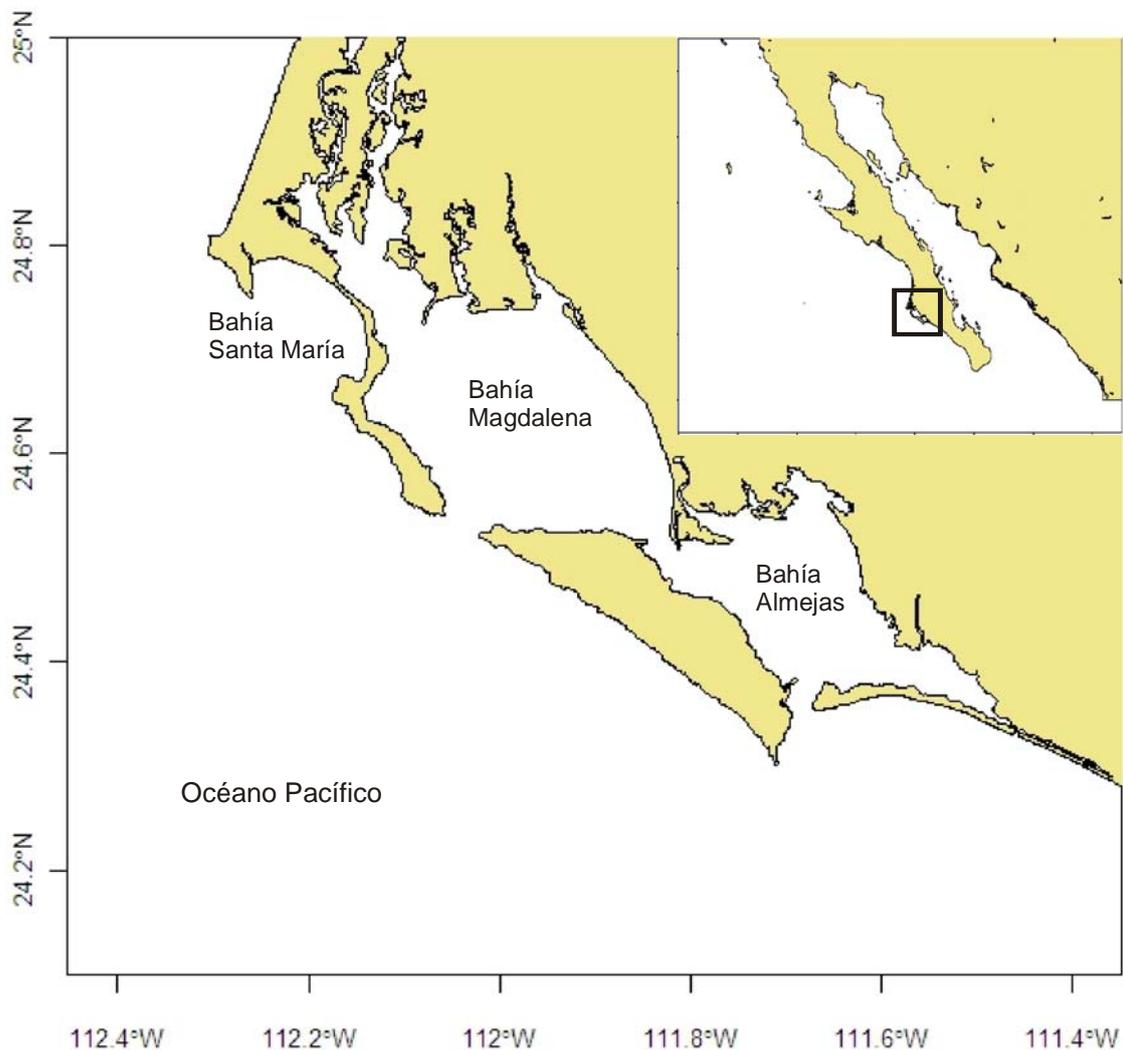


Figura 3. Área de estudio.

## TRABAJO DE CAMPO

Los organismos fueron obtenidos de la red de pesca, tomándose 70 ejemplares de sardinas por cada lance de pesca realizado. De la muestra obtenida de la red se tomo una submuestra al azar de 20 ejemplares y se colocaron en una solución anestésica de 2-fenoxietanol (Sigma-Aldrich P 1126) a 400 p.p.m. (Summerfelt y Smith, 1990). Cada uno de estos 20 ejemplares fue etiquetado a modo de hacer un seguimiento individual de cada una de las muestras tomadas. Se les tomo una muestra de sangre por punción caudal, utilizando jeringas de 3 ml, con agujas 21 G, tratando de obtener un mínimo de 1.5 ml de sangre. La muestra se colocó en un tubo vial de 2 ml, sin anticoagulantes. En cuanto se depositó la sangre en el tubo se tomaron las muestras para la determinación del hematocrito (Hc), introduciendo los capilares con heparina por duplicado en el tubo vial, haciéndose de forma rápida para evitar la formación de coágulos. Los capilares se etiquetaron con el número correspondiente del organismo y se mantuvieron a una temperatura aproximada de 4°C para su posterior procesamiento en laboratorio.

Después se tomó el frotis sanguíneo correspondiente, colocando una gota pequeña de sangre en un extremo del portaobjetos, previamente numerado y lavado en alcohol etílico absoluto. La gota se extendió sobre la superficie del portaobjetos con la ayuda de otro portaobjetos. El frotis se dejó secar, se fijó en alcohol etílico absoluto (Martoja y Martoja, 1970) para su posterior procesamiento en laboratorio. El resto de la muestra de sangre se mantuvo en el tubo vial y se conservaron todas las muestras en hielo para ser procesadas en el laboratorio después del desembarque.

Los 70 organismos recolectados, fueron fijados de acuerdo con el procedimiento indicado en el manual del programa de muestreadores a bordo (PROMA) (Torres-Villegas *et al.* 2002). A los 20 ejemplares que se les tomo muestra de sangre se les colocó una etiqueta con el número correspondiente para su identificación durante el procesamiento en laboratorio. A cada ejemplar se le realizó un corte ventral desde el ano hasta la región opercular y dos cortes laterales a la altura de las aletas pélvicas, esto con el fin de que la solución de formalina (al 10% amortiguado con fosfatos) penetrara en la región abdominal y permitiera la correcta fijación de los órganos internos.

## **TRABAJO DE LABORATORIO.**

En el laboratorio se registraron los datos morfométricos de todos los ejemplares: longitud patrón (LP) con ictiómetro (0.01mm), peso total (PT) y peso de la gónada (PG) por medio de una balanza granataria (0.001 g). A partir de los datos morfométricos se obtuvieron los siguientes parámetros de la población muestreada:

### **- Distribución de frecuencia de tallas.**

Se hizo el seguimiento de la composición por tallas de los ejemplares capturados para cada uno los meses en las diferentes temporadas reproductivas. Los datos de longitud patrón se agruparon en intervalos de 10 mm, entre un valor mínimo de 110 hasta un máximo de 210 mm y fueron graficados en histogramas como frecuencia relativa de cada intervalo. También se obtuvo el valor de la talla promedio mensual y la desviación estándar por sexos para cada temporada reproductiva.

### **- Relación peso-longitud.**

Se determinó la relación peso-longitud con el grupo de ejemplares recolectados durante las diferentes temporadas reproductivas. La estimación se realizó para cada mes de muestreo y por sexos. Se utilizó la fórmula propuesta por Keis (1928) (Froese, 2006):

$$W = a L^b$$

Donde:

**W**= peso total

**L**= longitud patrón

**a** y **b**= parámetros determinados por la regresión lineal.

Debido a que la relación peso-longitud no es lineal en los cupleidos, fue necesario transformar los datos, obteniendo los logaritmos del peso y la talla para aplicarlos a la ecuación lineal:

$$\ln W = \ln a + b \ln L$$

Los parámetros y las variables son las mismas que se definieron para la relación peso-longitud. Se consideró que el crecimiento fue isométrico si el valor del parámetro **b** fue igual a 3 y alométrico cuando el valor fue menor o mayor a 3. Para determinar si había diferencias significativas respecto al valor de 3 se aplicó la prueba t-student y se realizó un análisis de

varianza para determinar si había diferencias significativas entre las relaciones peso-longitud mensual y entre sexos.

#### **- Factor de condición**

El factor de condición (FC) fue utilizado como un indicador del estado de bienestar de un organismo, asumiendo que un organismo con un peso mayor en una longitud determinada se encuentra en mejor condición (Froese, 2006). Para estimar la condición de los organismos se utilizó el factor de condición de Fulton:

$$K= 100 (W/L^b),$$

Donde:

**K**= valor del factor de condición

**W**= peso del organismo sin gónadas

**L**= longitud patrón

**b**= coeficiente de crecimiento alométrico

El valor es multiplicado por 100 para aproximar **K** a la unidad.

En la formula original el valor de la longitud patrón se eleva al cubo puesto que se consideraba que el crecimiento tenia un incremento al cubo respecto al incremento en la talla (crecimiento isométrico), pero para especies en las que el crecimiento ocurre de manera alométrica se utiliza el parámetro **b** resultante de la regresión peso-longitud (Olim y Borges, 2006). Se obtuvieron los valores promedio del factor de condición por mes de muestreo y por sexos, utilizando el análisis de varianza para determinar diferencias significativas.

#### **- Proporción de sexos.**

Se estimo la proporción de sexos para cada mes de muestreo, contabilizando el número total de machos y hembras obtenidas.

#### **- Índice gonadosomático**

El índice gonadosomático (IGS) se utilizó como un indicador del crecimiento de las gónadas, siendo esto una estimación aproximada del grado de madurez de los organismos. Para esto se utilizaron los datos del peso del organismo y el peso de las gónadas, con los cuales se calculo el IGS mediante la siguiente formula:

$$IGS = (Wg/Wt - Wg) 100$$

Donde:

Wg= peso de la gónada

Wt= peso total del organismo

El producto fue multiplicado por 100 para expresar el resultado de la proporción en valores enteros. Este índice fue aplicado para ambos sexos en todos los lances de pesca recolectados, haciendo el seguimiento mensual obteniendo los valores promedio y su desviación estándar y aplicando el análisis de varianza para determinar diferencias significativas en las variaciones del IGS entre las diferentes temporadas reproductivas.

### **ANÁLISIS HISTOLÓGICO**

Se disectaron las gónadas de 2848 ejemplares, conservándose en solución reguladora de fosfatos con formalina al 10 %. Se tomaron submuestras de la parte media de las gónadas, las cuales se procesaron con la técnica de inclusión en parafina para su estudio histológico. Las piezas se lavaron con agua corriente para eliminar el exceso de fijador, después se procedió a la deshidratación en un procesador automático de tejidos Marca Sakura utilizándose alcohol etílico en concentraciones crecientes (80°, 96° y 100°). La transparentación se realizó en una mezcla 1:1 de alcohol absoluto-cloroformo, y después en cloroformo. Las muestras se pasaron a parafina a 56° C (PF), y la inclusión definitiva se hizo en parafina de 60 °C (pF). Se hicieron cortes finos a 3 µm aproximadamente en un micrótopo MICROM HM 355S. Los cortes se colorearon utilizando las técnicas de hematoxilina-eosina, tricrómica de Mallory y de van Gieson para la exploración microscópica (Martoja y Martoja, 1970). Las laminillas etiquetadas se clasificaron y registraron en la colección del laboratorio de Morfofisiología del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del IPN.

### **DETERMINACION DE LOS ESTADIOS DE MADUREZ GONÁDICA.**

Los criterios para asignar los estadios de maduración gonádica en peces teleósteos han sido establecidos para las hembras de diferentes especies, por diversos autores (Wallace y Selman, 1981; Hunter y Macewicz, 1985; Tyler y Sumpter, 1996; Ochoa-Báez, 1998). En el caso de las hembras de sardina monterrey también fueron utilizadas las descripciones de Torres-Villegas et al. (1997).

Con la finalidad de seguir los cambios morfológicos durante el crecimiento y maduración de los oocitos en la fase preovulatoria se utilizaron como indicadores la presencia de estructuras intracelulares en el ooplasma y del folículo, en cada estadio del crecimiento de los oocitos. Las estructuras intracelulares utilizadas fueron: núcleos, nucléolos, ooplasma, alvéolos corticales, inclusiones lipídicas, vitelo primario, vitelo intermedio, formación de gota de aceite o proteólisis y la hidratación del vitelo; descrito en otras especies de teleósteos (Wallace y Selman, 1981; Hunter y Macewicz, 1985; Tyler y Sumpter, 1996; Ochoa-Báez, 1998). Y para la sardina monterrey, se utilizó la propuesta de Torres-Villegas et al. (1997). En el caso del folículo se hizo una caracterización haciendo el seguimiento los cambios en la formación de la capa granulosa y la transformación de de células granulosa columnares, posterior al estadio de vitelo intermedio, descrita como una característica particular de la especie (Torres-Villegas, 1997).

De acuerdo con estos autores, durante el crecimiento del oocito se distinguen tres etapas progresivas: el crecimiento primario, crecimiento secundario y maduración, notándose diferencias en cuanto a los estadios que se presentan en las diferentes fases de crecimiento. Siguiendo los criterios establecidos por estos autores en el seguimiento de la maduración de los oocitos se consideraron los siguientes estadios de desarrollo para cada fase de crecimiento del oocito: para el crecimiento primario se consideró el estadio de oocitos perinúcleolares; para el crecimiento secundario se consideraron los estadios de alvéolos corticales, inclusiones lipídicas, vitelogénesis dividida en inicial e intermedia y el estadio de células de la granulosa columnares; en la fase de maduración se consideraron los estadios de integración de la gota de aceite o proteólisis, núcleo migratorio e hidratación.

También se consideró dentro del análisis histológico, la atresia folicular, como un indicador de la suspensión o inhibición del crecimiento y desarrollo normal de la actividad reproductiva de los organismos, por lo que la presencia de atresia en el ovario de la sardina monterrey también fue registrada para asociarla al resto de los indicadores morfofisiológicos analizados. De igual manera se registro la presencia de los folículos postovulatorios como evidencia de actividad reproductiva o desove.

El seguimiento de la proporción de los estadios de desarrollo más avanzado de los oocitos solamente se realizó en los meses en que se obtuvieron muestras de sangre para los análisis hormonales, esto con la finalidad de presentar de manera puntual cuales eran los

estadios que dominaban al momento de ser tomadas las muestras y su posterior relación con los demás parámetros tomados. Estos datos se presentaron como frecuencias relativas para cada mes de muestreo de las diferentes temporadas reproductivas.

### ***DETERMINACIÓN DE ESTRADIOL Y CALCIO EN SUERO SANGUÍNEO.***

Las muestras de sangre obtenidas a bordo de la embarcación fueron procesadas inmediatamente después del desembarque, manteniéndose todo el tiempo en hielo para evitar la hemólisis. El suero se obtuvo dejando coagular la sangre en el tubo, posteriormente se centrifugaron todas las muestras para separar completamente el suero y el coagulo a 3500 r.p.m durante 5 minutos. Las muestras de suero se mantuvieron en hielo hasta un máximo de 24 horas y después de este tiempo se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta por un máximo de 60 días de acuerdo con las especificaciones de los equipos utilizado para las cuantificaciones de estradiol y calcio.

Las cuantificaciones de estradiol ( $\text{E}_2$ ) se realizaron a 154 muestras de suero sanguíneo de hembras, utilizando la técnica de inmunoensayo de enzimas competitivo (ELISA) en un equipo AIA-PACK E2 (No. Cat. 020274). De acuerdo al fundamento de la prueba el estradiol presente en la muestra compite con la enzima por el sustrato, el cual es un anticuerpo específico adherido a esferas magnéticas. El exceso de enzima es eliminado y se incubó la muestra con un sustrato fluorogénico. La cantidad de enzima unida al sustrato es inversamente proporcional a la cantidad de estradiol en la muestra. La especificidad de la muestra fue probada por reacción cruzada, la cual se expresa en términos del porcentaje de concentración de cada sustancia que pueda causar un 50% de desplazamiento. En esta prueba no se considera un desplazamiento significativo por otro tipo de estrógenos, siendo el más alto la estrona con un 8.8% de desplazamiento. El valor mínimo que detecta la prueba es de  $15 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , con un coeficiente de variación de 4%.

Las determinaciones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) se realizaron mediante espectrofotometría reflejante a 680 nm en un equipo Vitros DT (Johnson y Johnson). El análisis se basa en la reacción del calcio con un indicador seco (arsenazo III), con el que forma un compuesto coloreado. La densidad del compuesto está relacionado con la concentración de calcio en la muestra. El valor mínimo que detecta el equipo es de  $3 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ , con un coeficiente de variación aproximado de 1.3%.

Con los resultados obtenidos de las cuantificaciones de estradiol y calcio en suero sanguíneo se obtuvieron los valores promedio y la desviación estándar para cada mes de muestreo. Posteriormente se hizo un análisis para determinar las variaciones en las concentraciones de estradiol y calcio asociando los valores obtenidos al estadio de desarrollo más avanzado del oocito determinado para cada una de las hembras de las que se obtuvo muestra de sangre. Dentro del análisis de estos parámetros se hizo una agrupación de los datos por la hora de colecta para determinar si existe variación en las concentraciones a lo largo del día. En cada uno de los análisis realizados se utilizó el ANDEVA para determinar las diferencias significativas que pudieran presentarse.

### **PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS.**

Para la obtención de los parámetros hematológicos se emplearon un total de 156 organismos en los que se procedió de la siguiente manera. Los tubos capilares para la determinación del HC se centrifugaron a 3500 r.p.m. durante 7 minutos para separar el suero del paquete celular, midiéndose la proporción suero-paquete celular, obteniendo el promedio de las dos muestras (Houston, 1990). Los resultados obtenidos fueron asociados al estadio de desarrollo más avanzado de los oocitos para cada hembra, obteniéndose los valores promedio por estadio y su desviación estándar.

### **CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS Y CONTEOS DIFERENCIALES EN EXTENSIONES SANGUÍNEAS.**

Para los conteos diferenciales de eritrocitos y leucocitos se realizaron los frotis o extensiones sanguíneas de 156 hembras. Se utilizó el método de Romanowsky para describir la morfología de las células sanguíneas (Cannon *et al.*, 1980; Houston, 1990). Los criterios empleados para la descripción se basaron en las características de coloración de la serie de células rojas y blancas, así como la coloración de los núcleos y gránulos citoplasmáticos descritos en otras especies de peces teleósteos (Hamers, 1995a; Hamers, 1995b; Rough *et al.*, 2005; Tavares-Dias, 2006a; Tavares-Dias, 2006b; Shigdar *et al.*; 2007). También se tomaron medidas para obtener las tallas promedio de los diferentes tipos de células, tanto de la serie roja como de la serie blanca, para la caracterización morfológica. Las observaciones microscópicas se hicieron en un microscopio Axioscope. Esto se realizó utilizando el programa de análisis de imágenes AxionVision de Carl Zeiss.

Los conteos diferenciales de eritrocitos se hicieron realizando conteos de 500 células de la serie roja, determinándose la proporción de células maduras (eritrocitos) y de células inmaduras (eritroblastos policromatófilos), reportándose como proporción relativa. Los conteos diferenciales de leucocitos se realizaron contando un mínimo de 100 células de la serie blanca. Se cuantificaron los linfocitos, los granulocitos (se agruparon los granulocitos basófilos y eosinófilos), neutrófilos y monocitos, reportándose como proporción relativa (Sherburne, 1973). En ambos conteos se buscaron los campos del frotis que tuvieran una distribución uniforme de las células, haciendo las observaciones al microscopio en objetivo de inmersión a 1000 aumentos nominales, en diferentes campos y en muestreos en zig-zag.

### **ANALISIS ESTADISTICOS.**

Se realizaron pruebas de distribución normal y homocedasticidad de los datos obtenidos. En los casos en que los datos no presentaron distribución normal estos fueron transformados a logaritmo natural. Se realizaron análisis de varianza de una vía (ANDEVA) utilizando como variables independientes el tiempo y los estadios de desarrollo de los oocitos, asociados a cada uno de los parámetros fisiológicos (concentraciones de estradiol y calcio y parámetros hematológicos). En caso de encontrarse diferencias significativas se utilizaron pruebas *a posteriori* para comparación de medias. La correlación de Spearman se utilizó para determinar las correlaciones existentes entre el desarrollo del oocito y los indicadores fisiológicos. Las pruebas estadísticas y los gráficos se realizaron utilizando el programa Statistica 7.0 (1984-2004).

Tabla 1. Indicadores morfológicos propuestos por Hamers (1995) y Rough (2005) en dos especies diferentes de peces teleósteos.

<i>Cyprinus carpio</i> , Hamers (1995).				<i>Thunnus maccoyii</i> , Rough et al. (2005)			
Tipos celulares	Forma de la célula	Núcleo	Citoplasma	Tipos celulares	Forma de la célula	Núcleo	Citoplasma
Neutrófilo	Redonda	Periférico, con uno o dos lóbulos.	Con gránulos redondos, ligeramente coloreados y vacuolas ocasionales.	Eritrocito	Elíptica	Central, elíptico, basófilo, cromatina compacta, densamente teñida	Puede contener gránulos de hierro
Heterófilo	Redonda	Núcleo grande y periférico sin lóbulos.	Con gránulos que varían en tamaño, forma y reacción a la coloración.	Reticulocito	Redonda	Central, redonda a oval, basofílico, pérdida de cromatina organizada.	Generalmente coloración azul grisácea
Eosinófilo	Redonda	Núcleo periférico pequeño	Gránulos más pequeños y fuertemente eosinofílicos.	Neutrófilo	Redonda	Excéntrico, o ligeramente fuera del centro, basofílico, monolobulado , ocupa el 30% de la célula.	Azul claro con Giemsa o fuertemente coloreados con negro Sudan y PAS positivos.
Basófilo	Redonda	Núcleo redondo y periférico.	No presentan coloración en los gránulos, presentan estructuras alveolares.	Eosinófilo	Redonda	Excéntrico, basofílico, monolobulado , típicamente ocupa mas del 30% de la célula, en eosinófilos pequeños puede ser hasta el 50%.	Gránulos gruesos y fuertemente eosinofílicos con Giemsa o negro Sudan. El citoplasma tiene material PAS positivo, los gránulos son negativos.
				Linfocito	Redonda-ovalada pseudopodia	Redondo, basofílico, ocupa prácticamente toda la célula	Halo delgado de azul pálido, con frecuencia gránulos basofílicos con negro sudan, sin reacción PAS positiva.
				Monocito	Redonda a irregular	Excéntrico, basofílico, monolobulado , ocupa del 40-50% de la célula	Azul grisáceo, con una o más vacuolas.
				Trombocitos	Elongada, oval, espiculada (en punta) o en huso	Elíptico, compacto y fuertemente basófilo, ocupa la mayor parte de la célula.	

## RESULTADOS

### 1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN MUESTREADA

Los muestreos analizados procedentes de la zona de Bahía Magdalena confirmaron la temporada reproductiva desde diciembre a abril en los diferentes años de muestreo, con el máximo de desove en febrero y marzo. Las características de las muestras recolectadas, como longitud patrón (LP), peso total (PT), factor de condición (FC), índice gonadosomático (IGS), expresados todos en valores promedio mensuales, se describen a continuación.

#### 1.1. DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIA DE TALLAS.

De enero de 2003 a abril de 2006 se obtuvieron 13 lances de pesca, con un total de 2848 ejemplares de *S. sagax*; de los que se obtuvieron datos longitud y peso. Los datos del número de lances y ejemplares recolectados por cada temporada reproductiva se presentan en la tabla 2. Son evidentes las diferencias en el tamaño de muestra obtenido en los diferentes lances de pesca, la captura mínima fue en febrero de 2005 representado tan solo por 18 ejemplares mientras que en abril de 2003 se obtuvo el máximo con 551 ejemplares.

Tabla 2. Relación de los lances de pesca comercial obtenidos durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006 en Bahía Magdalena, Baja California Sur.

FECHA	No DE LANCES DE PESCA	No DE EJEMPLARES
Ene-03	1	90
Feb-03	1	70
Abr-03	8	551
Feb-04	3	184
Mar-04	5	321
Dic-04	7	348
Ene-05	1	66
Feb-05	1	18
Mar-05	4	222
Abr-05	4	274
Feb-06	4	280
Mar-06	1	70
Abr-06	5	350

Los gráficos de la distribución de frecuencia de tallas se presentan por mes, de enero a abril, incluyéndose un único muestreo de diciembre de 2004 (Figura 4). En los meses de enero y febrero de 2003 al 2006 se observó que los intervalos de tallas van de 110 a 180 mm de LP, con una media que se encontró entre los 130 y 140 mm. Para el mes de marzo se observaron intervalos de tallas diferentes. En 2004 el intervalo va de 120 a 150 mm, en 2005 es de 130 a 190 mm y en 2006 de 150 a 200 mm de LP, con medias de 140, 150 y 180 mm respectivamente. En abril se observó que la distribución de frecuencia de tallas presenta un

patrón similar en las diferentes temporadas reproductivas. El intervalo de tallas fue de 130 a 180 mm para 2003 y 2005, mientras que en 2006 el intervalo se recorrió de 140 a 200 mm. Durante el periodo de estudio solo se pudo realizar un muestreo en diciembre en el 2004. En este mes las tallas fueron de 120 a 180 mm y la media se ubicó en los 130 mm.

Al comparar los valores promedio mensuales de LP se observaron diferencias significativas ( $p < 0.001$ ). Las diferencias más importantes se encontraron en cuatro meses que difieren entre ellos y con el resto de los meses de muestreo. El primer grupo es el de febrero y marzo de 2004 con talla promedio aproximada a 160 mm, el segundo grupo es marzo de 2006 con la talla promedio mas alta de 183 mm y el tercer grupo es abril de 2006 con 163 mm de LP. El resto de los valores promedio oscilaron entre los 134 y 148 mm. La comparación de la distribución de frecuencia de tallas y de los valores promedio mensuales permitió observar que hay variaciones interanuales en las tallas. De manera general se observó que en 2003 y 2005 la pesca incidió sobre organismos con tallas entre los 138 y 151 mm, en 2004 la talla fue de los 151 a 161 mm y en 2006 se encontró entre 134 y 183 mm de LP.

Al analizar las tallas por sexos se observaron diferencias significativas entre machos y hembras en febrero y diciembre de 2004, marzo de 2004, abril de 2005 y febrero de 2006 donde las hembras alcanzaron una talla promedio mayor que la de los machos. El resto de los meses no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) de tallas entre sexos.

## **1.2. RELACIÓN PESO-LONGITUD**

En las Figuras 6 y 7 se presentan las tallas y pesos promedio de cada uno de los lances de pesca muestreados. Se observaron diferencias significativas (Tabla 3) en cuatro meses que difieren entre ellos y con el resto de los meses de muestreo: febrero y marzo de 2004 con talla promedio de 160 mm, el segundo grupo es marzo de 2006 con la talla promedio de 183 mm y el tercer grupo es abril de 2006 con 163 mm de LP. Los datos de peso promedio también presentaron la misma tendencia: se observaron diferencias significativas (Tabla 4) en los meses de febrero y marzo de 2004 con 61.7 y 63.6 g de peso promedio respectivamente, marzo de 2006 con 76.4 g que fue el peso promedio mas alto del periodo de estudio y abril de 2006 con 63.7 g. El peso mas bajo se observó en febrero de 2005 con 32.4 g.

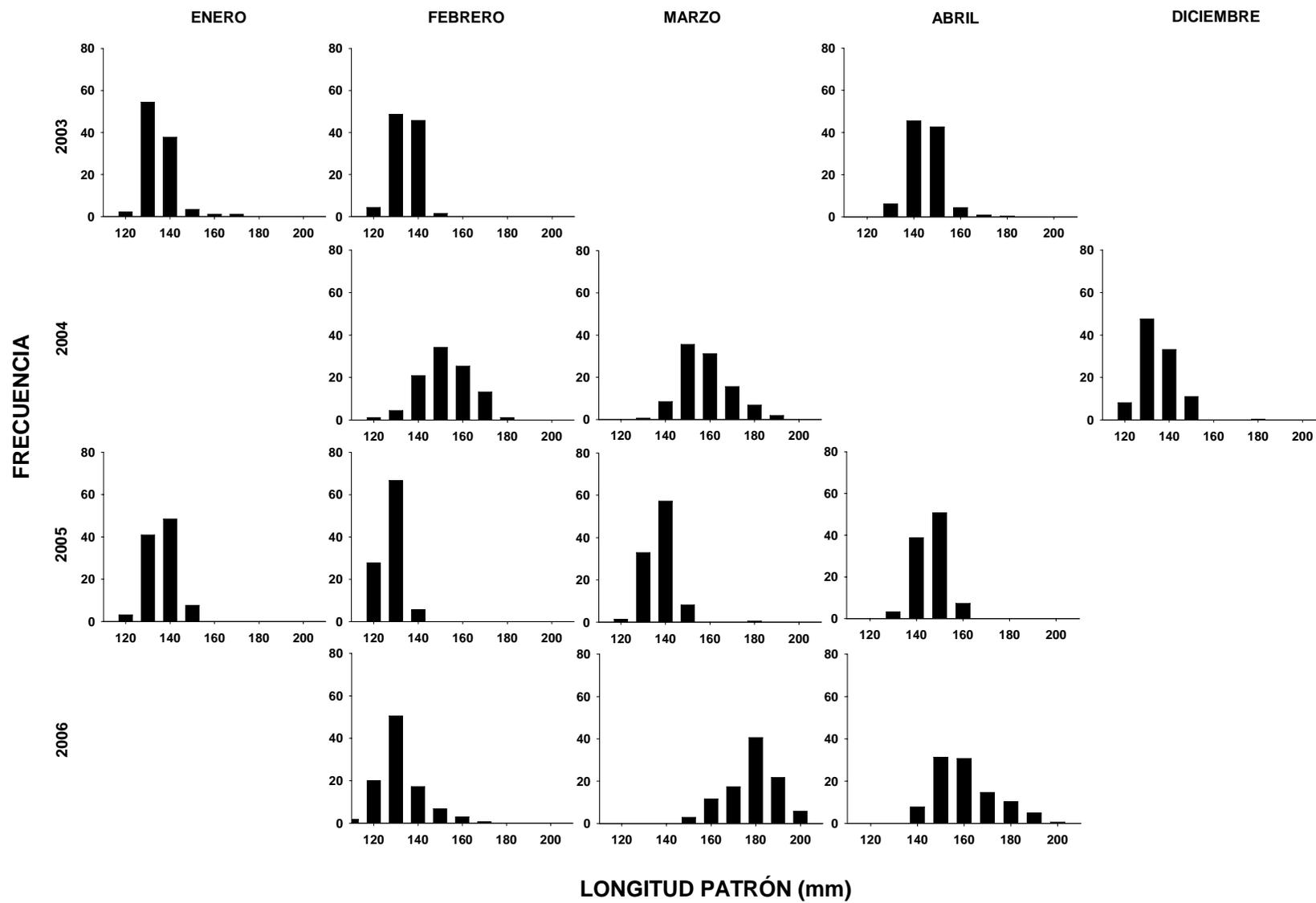


Figura 4. Distribución de frecuencia de tallas de la captura comercial de *S. sagax* durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.

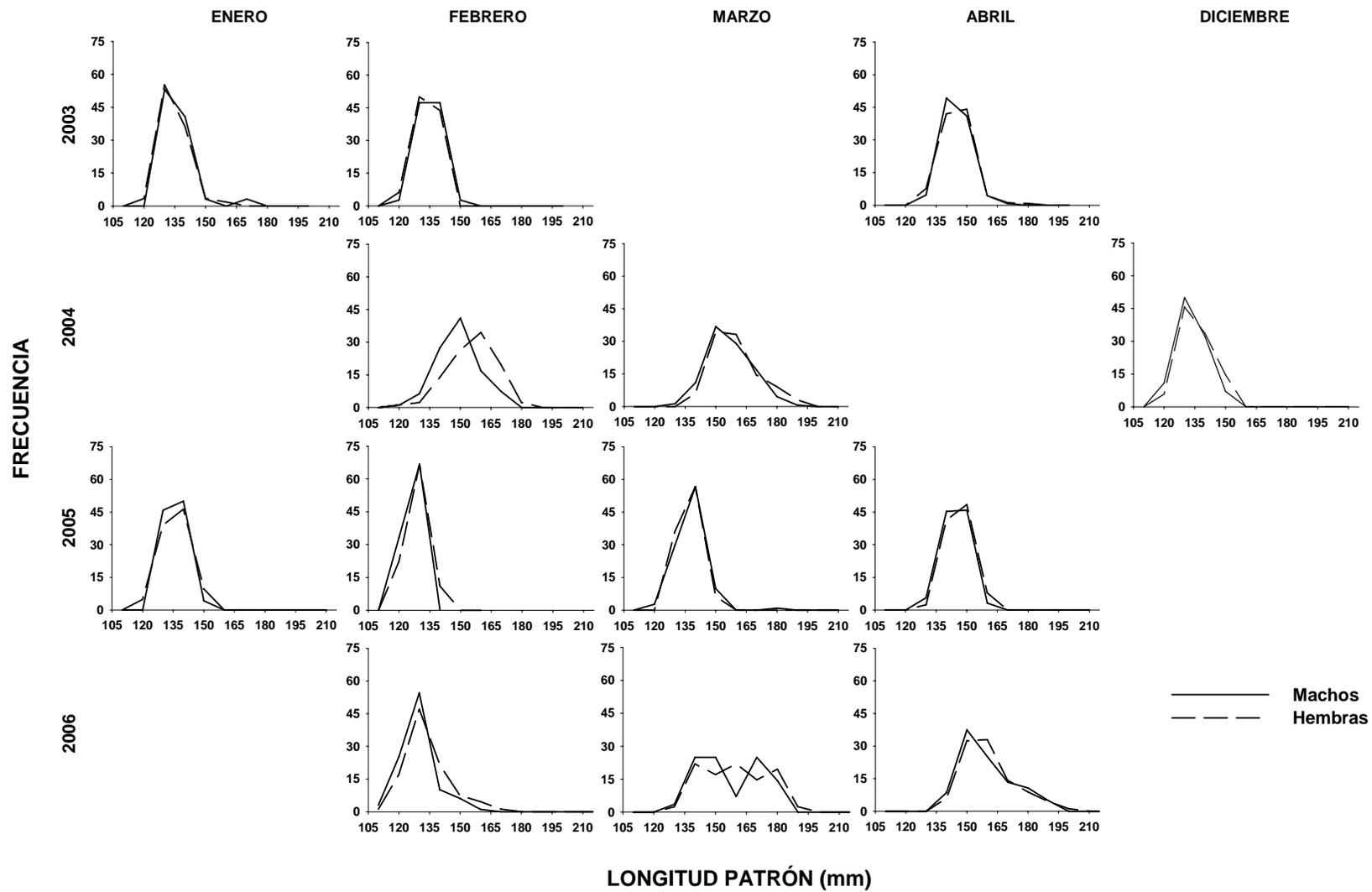


Figura 5. Distribución de frecuencia de tallas por sexos de la captura comercial de *S. sagax* durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.

Tabla 3. Resumen del análisis de varianza de la longitud patrón (LP) de *S. sagax* durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.

N	Promedio	Mínima	Máxima	Desv estandar
2842	149.3936	116.0000	210.0000	13.63064
SS	df	MS	F	p
287577.9	12	23964.82	282.1755	0.00

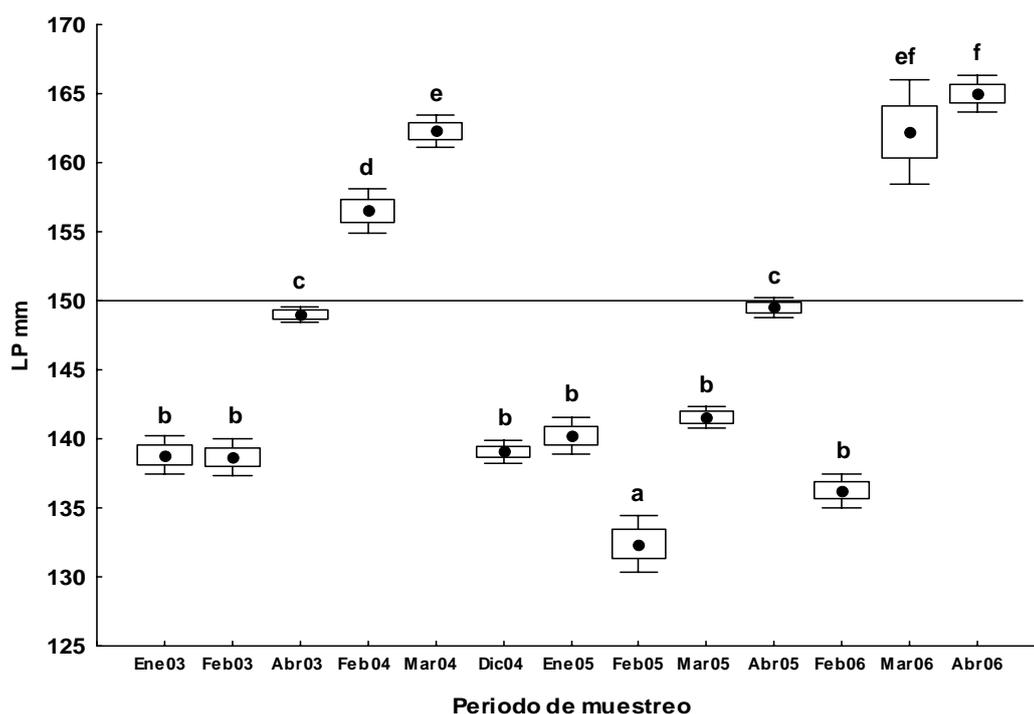


Figura 6. Longitud patrón promedio mensual de *S. sagax* para las temporadas reproductivas de 2003 al 2006. La línea señala la talla de primera madurez establecida para la sardina monterrey.

El análisis de la relación peso-longitud ( $W=a L^b$ ) se realizó de manera mensual por temporada reproductiva para obtener los valores de la relación (Tabla 5). Se observaron variaciones de los valores de  $b$  en las diferentes temporadas reproductivas con valores que van de 2.244 (febrero de 2005) hasta 2.943 (abril de 2006). En todas las muestras analizadas el valor de  $b$  es menor de 3, que puede considerarse como un crecimiento alométrico negativo. Los valores del coeficiente de correlación de la regresión ( $r^2$ ) presentaron una relación directa, con valores que van desde 0.59 hasta 0.96, observándose una correlación más alta en marzo de 2004 y febrero y marzo de 2006 ( $r^2 > 0.90$ ) y la mas baja en febrero de 2005 ( $r^2 = 0.59$ ).

Tabla 4. Resumen del análisis de varianza de la longitud patrón (LP) de *S. sagax* durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.

N	Promedio	Mínima	Máxima	Desv estandar
2842	52.41414	18.20000	147.6000	16.00401
SS	df	MS	F	p
389610.1	12	32467.50	271.7065	0.00

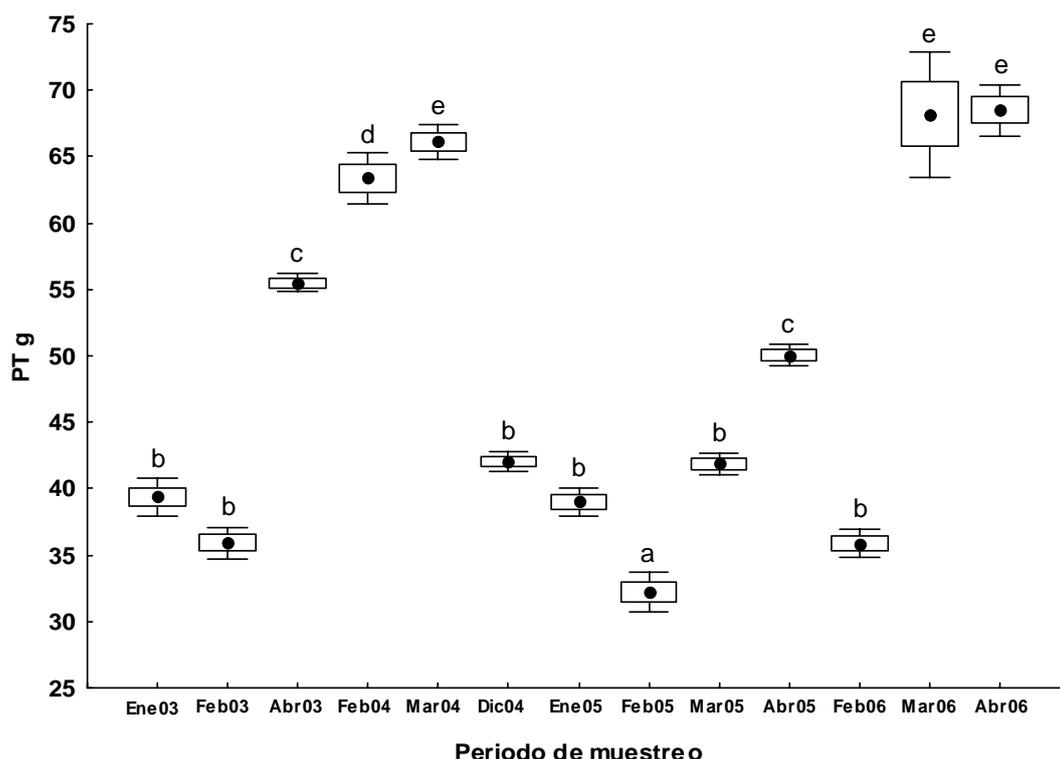


Figura 7. Peso total promedio mensual de *S. sagax* para las temporadas reproductivas de 2003 al 2006.

Al analizar la relación peso-longitud por sexos se observaron valores diferentes en los parámetros  $b$  y  $r^2$  a los obtenidos en el análisis poblacional (tabla 6). En la temporada reproductiva de 2003 al inicio las hembras presentaron un valor de  $b$  más bajo que el de los machos, en los meses siguientes las hembras presentaron valores mayores. Se pudo observar un incremento de enero a febrero y su posterior descenso en abril, lo que implicó un cambio en la condición de los organismos. En ambos sexos el valor más alto se presentó en febrero: 2.89 para los machos y 3.0 en hembras, lo que significa un peso proporcional respecto a la talla para estas últimas. Los valores de correlación no fueron mayores a 0.77 en ambos sexos, presentándose en esta temporada la correlación más baja del periodo de estudio para los machos que fue de 0.59.

Tabla 5. Parámetros de la regresión peso-longitud de los muestreos mensuales de las temporadas reproductivas de 2003 a 2006. Longitud patrón (LP) y peso (PT) máximos y mínimos, tamaño de muestra ( $n$ ), ordenada al origen ( $a$ ) y pendiente ( $b$ ) de la regresión, coeficientes de correlación ( $r^2$ ) y error estándar de  $b$ .

	LP max	LP min	PT max	PT min	n	a	b	$r^2$	E est b
Ene-03	176	125	81.1	30.5	90	1.61E-04	2.51	0.646	8.579
Feb-03	152	126	47.8	25.6	70	1.88E-05	2.928	0.725	10.615
Abr-03	182	130	93.1	34.2	551	1.31E-04	2.585	0.664	3.767
Feb-04	186	127	96.3	31	182	2.10E-05	2.934	0.899	4.144
Mar-04	194	137	105.6	41	321	8.68E-05	2.65	0.903	3.586
Dic-04	187	122	93.7	24.7	348	3.89E-04	2.343	0.673	3.633
Ene-05	151	126	48.1	27.5	66	4.49E-04	2.295	0.688	11.073
Feb-05	145	126	35.6	25.8	18	5.29E-04	2.244	0.591	24.877
Mar-05	180	122	73.4	29.2	222	6.28E-05	2.698	0.752	5.807
Abr-05	168	134	66.4	35.1	274	2.06E-05	2.932	0.832	5.651
Feb-06	173	116	75.9	18	280	2.27E-05	2.893	0.926	3.045
Mar-06	210	136	128.2	39.1	70	3.49E-05	2.829	0.966	5.064
Abr-06	204	141	146.2	35.6	350	1.97E-05	2.943	0.808	2.992

En 2004 el valor de  $b$  fue más alto en las hembras, observándose un decremento de febrero a marzo. En esta temporada los valores de correlación fueron mayores a 0.88, con un valor máximo de 0.91 en los machos de marzo. La siguiente temporada reproductiva inició en diciembre de 2004 con valores bajos de  $b$ : en machos de 2.09 y en hembras de 2.5. En esta temporada fueron muy evidentes los cambios en cuanto a la relación peso-longitud: se observó un valor mínimo en las hembras de 1.96 en febrero en tanto que los machos alcanzaron su valor máximo en ese mes (2.84). Después se dio un incremento en los valores de  $b$ , alcanzando el máximo en abril en ambos sexos (2.96).

En 2005 se presentaron los valores más bajos de  $r^2$  registrados durante todo el periodo de estudio, en los machos en enero (0.47) y en las hembras en febrero (0.56), lo cual implica una relación peso-longitud más variable. Para la temporada reproductiva de 2006 se observó en los machos un incremento en los valores de  $b$ , siendo en febrero de 2.74 y alcanzando en abril 2.9. En el caso de las hembras se presentó un ligero descenso en marzo (2.81), en febrero y abril se encontró por arriba de 2.94. En ambos sexos los valores de correlación fueron altos ( $> 0.78$ ).

Tabla 6. Parámetros de la regresión peso-longitud en machos (A) y hembras (B) de las temporadas reproductivas de 2003 a 2006. Se presentan la longitud patrón (LT) y peso (PT) máximos y mínimos, el tamaño de muestra (*n*), intercepción (*a*) y pendiente (*b*) de la regresión, coeficientes de correlación (*r*<sup>2</sup>) y error estándar de *b*.

<b>A</b>	LP max	LP min	PT max	PT min	<i>n</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>	E est <i>b</i>
Ene-03	176	130	80.3	33.1	32	5.24E-05	2.7359	0.693	14.3465
Feb-03	152	128	47.8	25.6	38	2.17E-05	2.8985	0.728	14.3587
Abr-03	170	132	81.6	38.6	277	1.95E-04	2.506	0.598	5.7962
Feb-04	175	127	87.8	31	95	3.28E-05	2.8428	0.897	6.0619
Mar-04	190	137	91.4	41	155	1.19E-04	2.5871	0.912	5.2176
Dic-04	155	122	58.2	24.8	156	1.29E-03	2.0995	0.606	5.7609
Ene-05	151	133	43.9	29.1	24	1.46E-03	2.0538	0.474	23.885
Feb-05	136	126	35.6	25.8	9	7.98E-05	2.63	0.617	43.5809
Mar-05	180	122	73.4	29.2	111	9.66E-05	2.6076	0.755	7.4998
Abr-05	165	134	66.1	35.1	149	1.74E-05	2.9665	0.827	7.5801
Feb-06	172	116	64.1	22.2	99	4.66E-05	2.7455	0.942	5.5067
Mar-06	187	137	91.1	39.5	28	2.94E-05	2.8629	0.969	8.3812
Abr-06	196	142	119.1	40	167	2.45E-05	2.902	0.821	4.1737

<b>B</b>	LP max	LP min	PT max	PT min	<i>n</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>	E est <i>b</i>
Ene-03	164	125	61.2	30.3	58	3.22E-04	2.3691	0.616	10.8469
Feb-03	147	126	44.4	25.9	32	1.28E-05	3.0085	0.726	15.9486
Abr-03	183	130	93.1	34.2	274	9.84E-05	2.642	0.717	4.9566
Feb-04	186	127	96.3	32.7	87	2.78E-05	2.8821	0.883	6.2487
Mar-04	194	145	105.6	42.5	166	7.32E-05	2.6847	0.894	5.0162
Dic-04	187	125	93.7	26.7	192	1.77E-04	2.5023	0.712	4.7701
Ene-05	151	126	48.1	27.5	42	3.37E-04	2.354	0.772	12.4989
Feb-05	145	127	35.6	26.6	9	2.05E-03	1.9696	0.562	31.049
Mar-05	157	130	52.1	29.3	111	2.49E-05	2.8888	0.787	9.1955
Abr-05	168	137	66.4	36.3	125	1.77E-05	2.9607	0.844	8.7967
Feb-06	173	117	75.9	18	181	1.75E-05	2.9466	0.919	3.7581
Mar-06	210	136	128.2	39.1	42	3.80E-05	2.8118	0.963	6.419
Abr-06	204	141	146.2	35.6	182	1.57E-05	2.9852	0.798	4.2913

### 1.3. FACTOR DE CONDICION

El factor de condición (FC) se calculó utilizando los valores de *b* obtenidos a partir de la regresión peso-longitud para cada sexo, las tendencias se muestran en la figura 8 para cada temporada de muestreo. Un valor alto del FC implica un peso mayor en una talla determinada y por tanto una mejor condición del organismo, dicho valor es inverso al valor del exponente *b*. Se encontraron diferencias muy marcadas entre las diferentes temporadas reproductivas. Para 2003 se observaron diferencias significativas entre los meses de muestreo y entre sexos en enero y abril (*p* < 0.001), el valor máximo se observó en las hembras de enero (0.032) y el mínimo en las hembras de febrero (0.0012), la tendencia fue una disminución del FC para ambos sexos de enero a febrero y una recuperación de los organismos para abril.

En el 2004 el FC presentó valores bajos en los meses de actividad reproductiva. En febrero no hay diferencias significativas del FC entre sexos, pero en marzo sí se encontró diferencia siendo mejor la condición de los machos. Diciembre de 2004 presentó una diferencia muy

marcada entre sexos: en los machos alcanzó un valor de 0.146 mientras que el de las hembras fue de 0.033. En enero de 2005 la tendencia se mantuvo, siendo más alto el FC en los machos que en las hembras, invirtiéndose en febrero con un valor de 0.20 en las hembras y de 0.033 en los machos. El resto de la temporada los valores fueron bajos con tendencia a disminuir al final de la temporada reproductiva.

La temporada reproductiva de 2006 fue la que presentó los valores más bajos de FC. Se observaron diferencias significativas entre sexos ( $p < 0.001$ ), el valor máximo en los machos para esta temporada se observó en febrero (0.0046) y el mínimo en marzo (0.0025), en las hembras el máximo fue en marzo (0.0038) y el mínimo en abril (0.0015). La variación en la condición de machos y hembras fue diferente ya que en los machos los valores disminuyeron de febrero a marzo mientras que en las hembras la condición mejoró de febrero a marzo y disminuyó en abril.

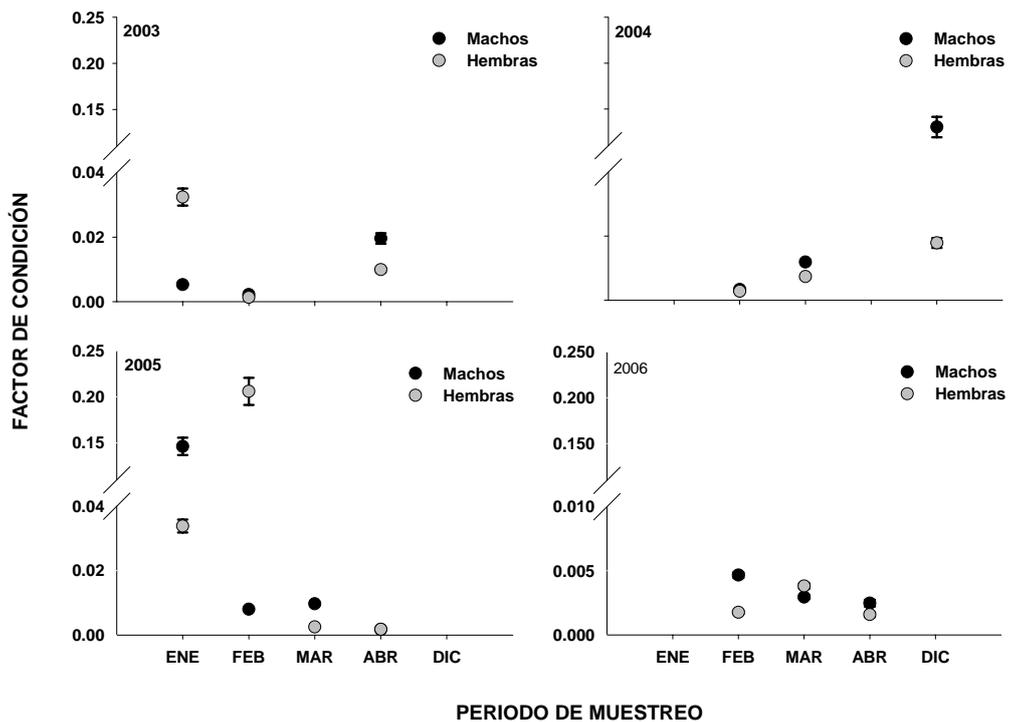


Figura 8. Variaciones del factor de condición de *S. sagax* durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.

#### 1.4. PROPORCIÓN DE SEXOS

Mediante el análisis visual de las gónadas se pudo asignar el sexo a cada organismo, sin encontrar organismos indiferenciados a lo largo del periodo de muestreo. Durante las diferentes temporadas reproductivas se pudieron observar variaciones en la proporción de

machos y hembras (M:H) (Tabla 7). En 2003 se observó una proporción baja de M:H, donde las hembras representaron el 64.4% del total de los organismos, mientras que en febrero la proporción fue mayor para los machos con un 54.3% y en abril la proporción fue cercana a 1:1.

En 2004 la proporción se mantuvo cerca de 1:1. En febrero los machos representaron el 52.2% y para marzo las hembras alcanzaron el 51.7% de los organismos muestreados. Puesto que la temporada reproductiva en la zona de estudio ocurre de diciembre a abril, en la temporada del 2005 se consideró el muestreo de diciembre de 2004. Al inicio de la temporada la proporción fue mayor para las hembras con un 55.2%. En enero la proporción cambio, las hembras representaron el 63.6% de la muestra; en febrero y marzo la proporción se encontró 1:1 y para abril la proporción cambia a 54.4% de machos en la muestra. En 2006 la proporción varió en los diferentes meses pero siempre fue mayor la proporción de hembras: en febrero la proporción fue de 64.6%, en marzo de 60% y en abril fue de 52.1%.

Como tendencia general se observó que la proporción de machos es menor al inicio de la temporada reproductiva, mientras que para los meses que se considera de mayor actividad reproductiva (febrero-marzo) la proporción se mantuvo cercana a 1:1, a excepción de la temporada de 2006 en la que no se observó en ninguno de los meses de muestreo la proporción 1:1 de machos y hembras.

Tabla 7. Proporción de sexos de *S. sagax* durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.

Mes	n	Frec. machos	Frec. hembras	Proporción	X2	P
Ene-03	90	32	58	0.6:1	7.511	0.006132332
Feb-03	70	38	32	1.2:1	0.514	0.473412397
Abr-03	551	277	274	1.:1	0.016	0.899343189
Feb-04	184	97	87	1.1:1	0.543	0.461192085
Mar-04	321	155	166	0.9:1	0.376	0.539751782
Dic-04	348	156	192	0.8:1	3.724	0.053635742
Ene-05	66	24	42	0.6:1	4.909	0.026717107
Feb-05	18	9	9	1.0:1.0	0	1
Mar-05	222	111	111	1.0:1.0	0	1
Abr-05	274	149	125	1.2:1	2.102	0.147106668
Feb-06	280	99	181	0.5:1	24.014	0.00000096
Mar-06	70	28	42	0.7:1	2.8	0.094264331
Abr-06	350	167	182	0.9:1	0.644	0.422266041

### 1.5. ÍNDICE GONADOSOMÁTICO

El análisis del índice gonadosomático (IGS) se realizó en cada una de las temporadas reproductivas, presentándose los valores promedio mensuales por sexos (Figura 9), encontrándose diferencias significativas (Tabla 8). La temporada de 2003 presentó valores bajos de IGS en ambos sexos, particularmente en febrero, que se considera mes de máxima actividad reproductiva, los valores del IGS en machos y hembras presentaron valores menores a 1, mientras que en los meses de enero y abril se presentaron valores mas altos, con máximo de 1.8 en las hembras y de 1.1 en los machos. El comportamiento del IGS fue inverso, los valores decayeron por completo en el mes en que se esperaba un valor alto.

En 2004 se registraron los valores más altos de IGS de todo el periodo de estudio, con valores en machos de 6.4 y en hembras de 5.6 en febrero, mientras que en marzo los valores fueron de 4.8 y 3.9 para machos y hembras. En la temporada 2005 se incluyó diciembre de 2004 por ser el inicio de la temporada reproductiva, se observaron valores bajos de IGS al inicio de la temporada (diciembre) con valores de 0.9 en machos y 1.4 en hembras. Para enero se dio un incremento de 2.7 machos y 2.2 hembras. En febrero los machos alcanzaron el valor más alto de la temporada (5.6), mientras que las hembras lo alcanzaron en el mes de marzo (4.1). Al final de la temporada reproductiva (abril) los valores de IGS no fueron mayores a 1.5.

Para la temporada de 2006 se observó un cambio en el comportamiento de la curva, ya que los valores de IGS más altos se presentaron el marzo a diferencia de las temporadas anteriores. En febrero los valores fueron de 3 y 3.7 y en marzo de 5.7 y 6.6 para machos y hembras. En abril se observó una caída drástica en los valores: en los machos llegó a 0.5 y en las hembras a 0.8.

Tabla 8. Resumen del análisis de varianza del IGS en hembras (IGSH) y en machos (IGSM) durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.

	<b>N</b>	<b>Promedio</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Desv estandar</b>
<b>IGS H</b>	<b>1501</b>	<b>2.545472</b>	<b>0.002660</b>	<b>12.45847</b>	<b>2.180129</b>
<b>IGS M</b>	<b>1341</b>	<b>2.466904</b>	<b>0.002079</b>	<b>13.09524</b>	<b>2.775063</b>

	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>IGS H</b>	<b>4262.866</b>	<b>12</b>	<b>355.2388</b>	<b>184.3996</b>	<b>0.00</b>
<b>IGS M</b>	<b>7996.329</b>	<b>12</b>	<b>666.3607</b>	<b>380.9450</b>	<b>0.00</b>

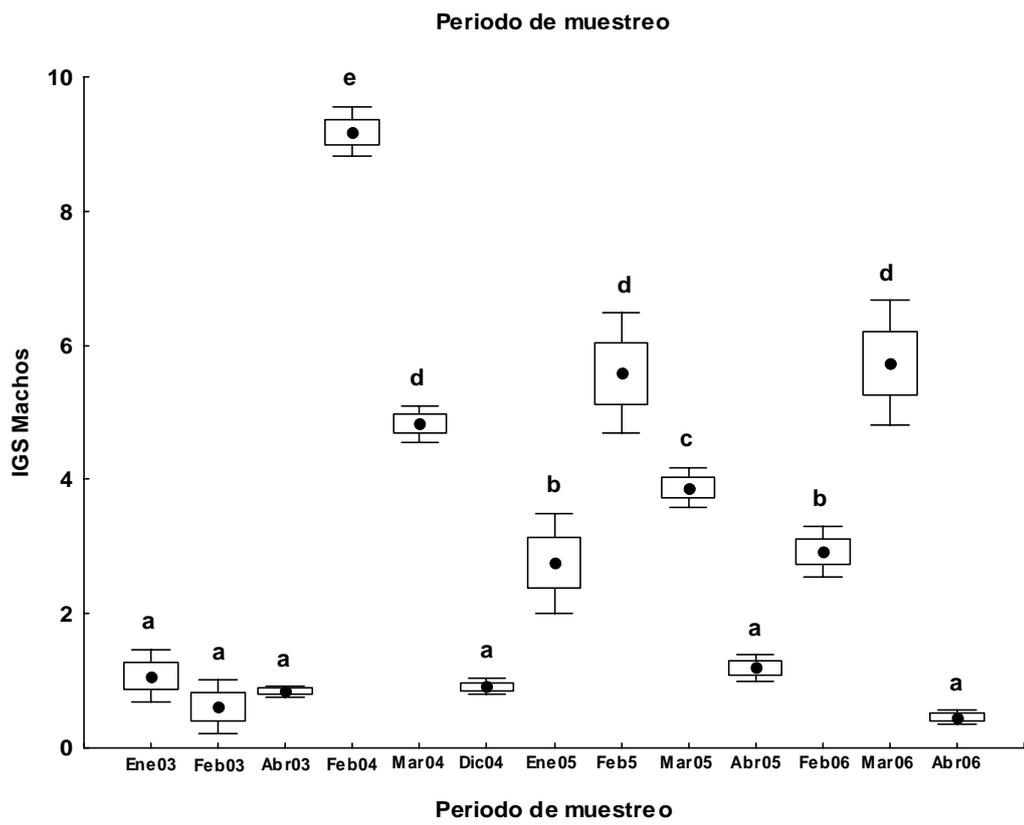
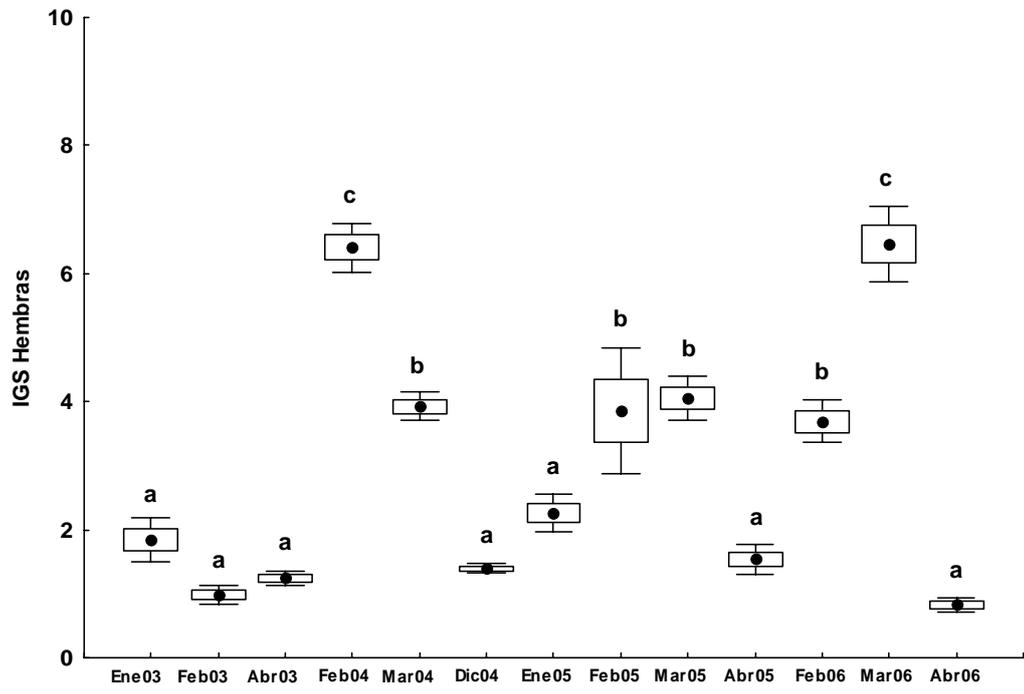


Figura 9. Variaciones del índice gonadosomático de *S. sagax* durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.

## 1.6. RELACIÓN DEL ÍNDICE GONADOSOMÁTICO Y EL FACTOR DE CONDICIÓN.

El análisis de la correlación entre el IGS y FC demostró que la correlación negativa en ambos sexos solo se presentó en marzo de 2004 y febrero de 2005, en enero de 2003 solo en hembras y enero de 2005 en machos, sin ser significativas. En el resto de los meses se observaron correlaciones positivas, siendo estas significativas solo en algunos meses (Tabla9).

Tabla 9. Parámetros de la correlación entre el IGS y FC por sexos para las diferentes temporadas reproductivas.

Mes	Sexo	n	FC	IGS	r	p
Ene-03	H	58	0.032431	1.847435	0.023	0.8642
	M	32	0.005270	1.073550	-0.2804	0.12
Feb-03	H	32	0.001286	0.983344	0.2587	0.1528
	M	38	0.002181	0.615825	0.4597	<b>0.0038</b>
Abr-03	H	274	0.009898	1.244458	0.0574	0.3436
	M	277	0.019596	0.844314	0.0643	0.2861
Feb-04	H	87	0.002792	6.406606	0.1532	0.1591
	M	97	0.003292	9.184522	0.0031	0.9761
Mar-04	H	166	0.007343	3.926630	-0.0456	0.5597
	M	155	0.011922	4.829804	-0.1329	0.0992
Dic-04	H	192	0.017861	1.395704	0.2785	<b>0.00009</b>
	M	156	0.130267	0.916482	0.0742	0.3573
Ene-05	H	42	0.033807	2.259790	0.034	0.8308
	M	24	0.146258	2.754716	-0.0721	0.7379
Feb-05	H	9	0.205981	3.860459	-0.498	0.1725
	M	9	0.008008	5.582364	-0.1948	0.6155
Mar-05	H	111	0.002494	4.064071	0.1783	0.0612
	M	111	0.009706	3.876692	0.2518	<b>0.0077</b>
Abr-05	H	125	0.001774	1.537687	0.1411	0.1166
	M	149	0.001749	1.197896	0.084	<b>0.03082</b>
Feb-06	H	181	0.001756	3.698021	0.2335	<b>0.0016</b>
	M	99	0.004664	2.923772	0.0278	0.7845
Mar-06	H	42	0.003813	6.462574	0.0548	0.7301
	M	28	0.002948	5.737146	0.122	0.5364
Abr-06	H	182	0.001590	0.825465	0.0365	0.6244
	M	167	0.002476	0.461687	0.0136	0.8616

## 2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DEL DESARROLLO DE LOS OOCITOS.

### 2.1. CRECIMIENTO PRIMARIO.

En esta fase se identificaron los estadios oogonias y oocitos perinúcleolares. Las oogonias fueron difíciles de localizar debido a su tamaño, observándose algunas agrupaciones de estas células, denominadas nidos, en el epitelio germinal y en el cual permanecen antes de pasar a formar parte del estroma (Figura 10). No se encontraron hembras que en sus ovarios presentaran de forma exclusiva el estadio de oogonias.

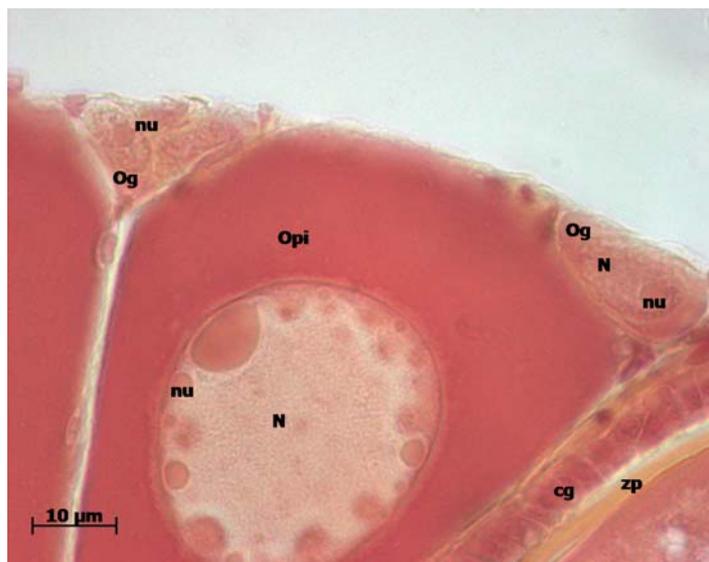


Figura 10. Microfotografía de ovario de *Sardinops sagax*. Se observan oogonias (Og) en diferentes etapas de desarrollo. Opi: oocito perinúcleolar inicial; N: núcleo; nu: nucleolos; cg: células de la granulosa; zp: zona pelúcida. Técnica van Gieson. Aumento 1000X.

### ESTADIO DE OOCITOS PERINUCLEOLARES.

Los oocitos perinúcleolares iniciales de *S. sagax* fueron células de forma poligonal, el citoplasma presentó una fuerte basofilia a la coloración de hematoxilina-eosina (Figura 11A). Los oocitos en este estadio presentaron un diámetro promedio de  $85.5 \mu\text{m}$  ( $\pm 22.75 \mu\text{m}$ ). El diámetro promedio del núcleo fue de  $41.83 \mu\text{m}$  ( $\pm 11.02 \mu\text{m}$ ). Presentaron varios nucleolos en su interior que variaron entre los  $2.5$  y  $9.9 \mu\text{m}$ , aunque en algunos oocitos se observaron pocos nucleolos pero de un diámetro mayor. En este estadio los nucleolos, de forma redondeada, se localizaron en la periferia interna del núcleo. Los oocitos perinúcleolares terminales mostraron nucleolos de un tamaño más uniforme, con forma ovoide, localizados junto a la parte interna de la membrana nuclear y se observó una disminución en la basofilia del citoplasma. Las células que conforman el folículo del oocito solo pudieron observarse a gran aumento como una capa de células planas que no permitieron distinguir entre las células de la teca y las de la granulosa (Figura 11B). Los estadios de oocitos perinúcleolares

iniciales y terminales se pudieron observar de manera consistente en todos los ovarios analizados, independientemente del grado de desarrollo gonádico del organismo.

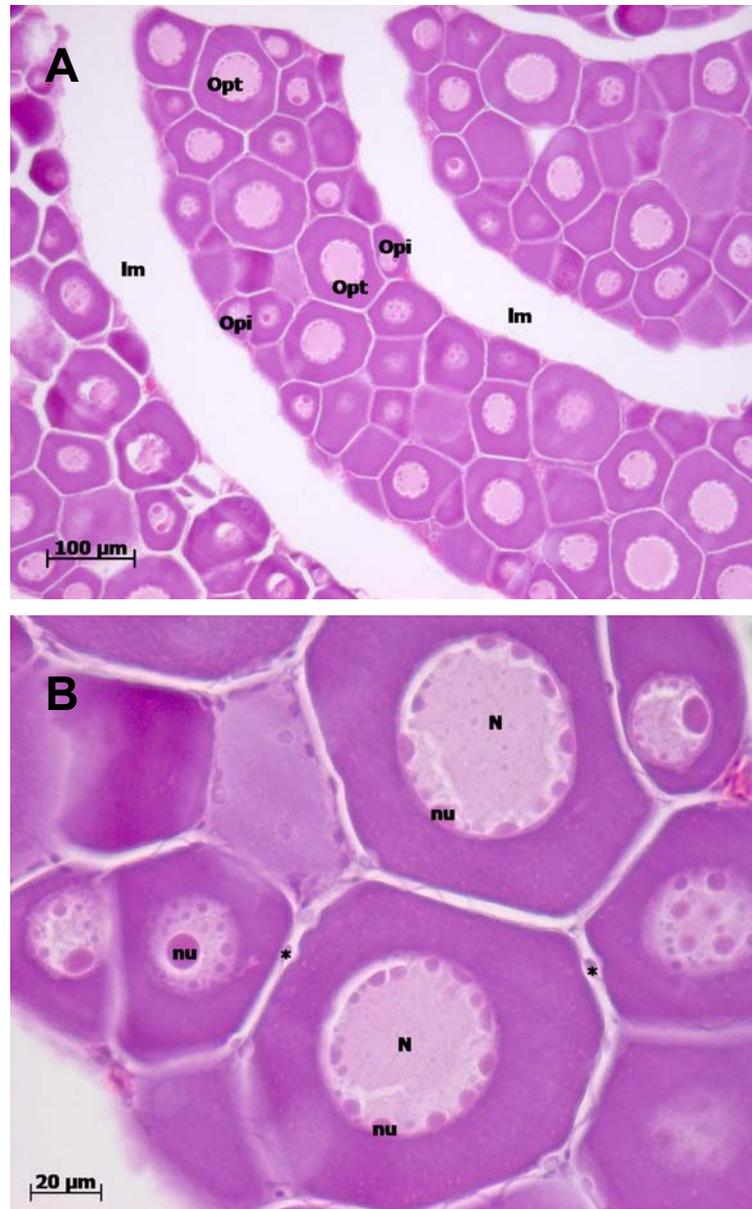


Figura 11. Microfotografía de oocitos en estadio perinúcleolar. A) Vista general de lamela ovárica. B) Grupo de oocitos perinúcleolares iniciales y terminales. lm: lumen; Opi: oocitos perinúcleolares iniciales; Opt: oocitos perinúcleolares terminales; N: núcleo; un: nucleolos;\*: células de la granulosa. Técnica hematoxilina-eosina. Aumento 100 y 400 X.

## 2.2. CRECIMIENTO SECUNDARIO.

En la segunda fase de crecimiento del oocito se advirtieron los cambios más evidentes en la morfología intracelular debido a la presencia de diferentes inclusiones citoplasmáticas características de cada estadio de crecimiento en particular. Estas inclusiones fueron

observadas de manera consistente, de tal forma que pueden encontrarse de manera discreta antes de finalizar el estadio próximo anterior.

#### **ESTADIO DE OOCITOS EN ALVEOLOS CORTICALES.**

En este estadio de crecimiento el oocito adquirió una forma mas redondeada e incremento su diámetro promedio a  $159.06 \mu\text{m}$  ( $\pm 11.84 \mu\text{m}$ ). El núcleo permaneció en posición central, con un diámetro de  $71.15 \mu\text{m}$  ( $\pm 10.5 \mu\text{m}$ ); los nucléolos se mantuvieron en la periferia del nucleoplasma. En este estadio disminuyó de forma considerable la basofilia y aparecieron las primeras inclusiones en el citoplasma, denominados alvéolos corticales (Figura 12A).

Aunque no se realizaron técnicas específicas para la identificación de los alvéolos corticales si se pudieron observar sus precursores con las diferentes técnicas de coloración utilizadas. Estas primeras inclusiones citoplasmáticas se observaron como pequeños espacios en la periferia del citoplasma, dentro de los cuales se encontraron los alvéolos corticales, muy cercanos a la zona pelúcida, que en este estadio se pudo apreciar como una banda localizada entre las células de la granulosa y el citoplasma del oocito, con cerca de  $0.67 \mu\text{m}$  de grosor. Las células que rodean al oocito han formado un epitelio en el cual las células de la granulosa alcanzaron midieron en promedio  $1.67 \mu\text{m}$ , siendo más evidentes que las de la teca, las cuales se mantuvieron como una capa de células planas (Figura 12B).

#### **ESTADIO DE OOCITOS EN INCLUSIONES LIPÍDICAS.**

En este estadio se dio un incremento en el diámetro de los oocitos ( $245.53 \pm 24.04 \mu\text{m}$ ), manteniéndose el núcleo en posición central con un diámetro promedio de  $84.04 \mu\text{m}$  ( $\pm 5.22 \mu\text{m}$ ), observándose alrededor de este la presencia de una zona de material ligeramente basófilo. Los nucléolos se observaron en la misma posición que en los estadios anteriores, presentando una forma irregular y una coloración más fuerte que el nucleoplasma (Figura 13A).

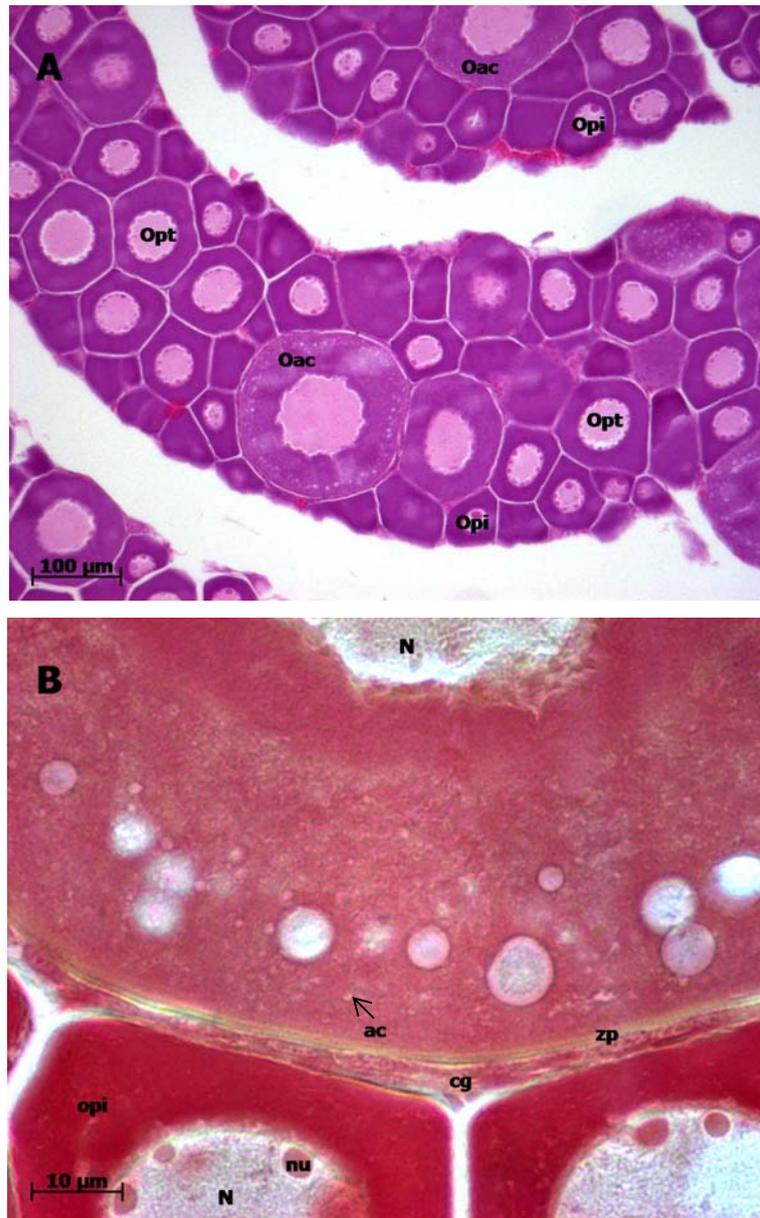


Figura 12. Microfotografía de oocitos en estadio de alvéolos corticales. A) Opi: oocitos perinúcleolares iniciales; Opt: oocitos perinúcleolares terminales; Oac : oocitos en alvéolos corticales. Técnica hematoxilina-eosina. B) Detalle de oocito en el que se aprecia el alvéolo cortical (ac). Opi: oocito perinúcleolar inicial N: núcleo; un: nucleolo; cg: células de la granulosa; zp: zona pelúcida. Técnica Van Gieson. Aumentos a 100 y 1000 X.

La aparición de las inclusiones lipídicas pudo apreciarse ya en el estadio anterior, sin embargo es en este estadio donde se hacen más evidentes. A diferencia de los alvéolos corticales estas inclusiones son de mayor tamaño y se localizan en la parte intermedia del citoplasma, apreciándose como espacios vacíos, sin afinidad a los colorantes. Esta característica se debe a su composición de origen lipídico y a que buena parte de estos compuestos se pierden durante el proceso histológico. Otros cambios notables son el

engrosamiento de la zona pelúcida que aumento a  $2.35 \mu\text{m}$  ( $\pm 0.23 \mu\text{m}$ ) y de las células de la granulosa ( $6.13 \pm 0.47 \mu\text{m}$ ) (Figura 13B). En etapas mas avanzadas de este estadio es posible apreciar la presencia de otro tipo de inclusiones que por su coloración y ubicación se consideran como los primeros gránulos de vitelo.

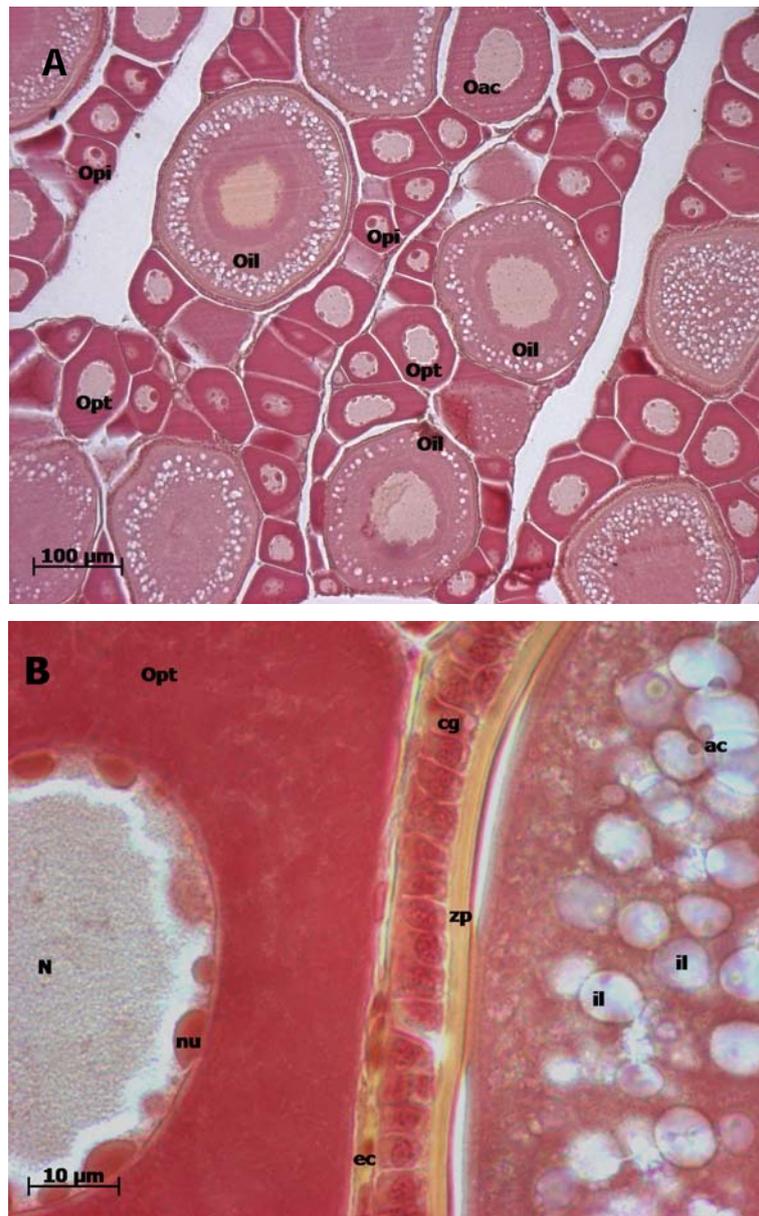


Figura 13. Microfotografía de oocitos en estadio de inclusiones lipídicas. A) Opi: oocitos perinucleolares; Oac: oocitos en alvéolos corticales; Oil: oocitos en inclusiones lipídicas. B) Detalle de oocitos en estadio perinucleolar tardío (Opt) y en inclusiones lipídicas (Oil). N: núcleo; nu: nucléolos; ac alvéolos corticales; il: inclusiones lipídicas; zp: zona pelúcida; cg: células de la granulosa; ec: eritrocitos. Técnica van Gieson. Aumentos 100 y 1000 X.

### **ESTADIO DE OOCITOS EN VITELOGÉNESIS.**

La vitelogénesis es un proceso de acumulación de reservas del oocito que ocurre de manera continua, por lo que este estadio se inicia con la aparición de los primeros gránulos de vitelo y concluye hasta que todo el oocito se encuentra lleno de gránulos, dándose además de esto un incremento considerable en la talla del oocito. En este trabajo el proceso se dividió en los estadios de vitelogénesis inicial y vitelogénesis avanzada para simplificar en cierta forma un proceso que es continuo.

### **ESTADIO DE VITELOGÉNESIS INICIAL.**

En la vitelogénesis inicial los oocitos un diámetro promedio de  $310.44 \mu\text{m}$  ( $\pm 20.97 \mu\text{m}$ ). El núcleo permanece en posición central con un diámetro de  $109.28 \mu\text{m}$  ( $\pm 13.98 \mu\text{m}$ ) y en su interior se observó material que por su coloración se consideraron como nucleolos, localizados cerca de la membrana nuclear y de forma irregular. Alrededor del núcleo se observó material de coloración más basófila que el resto del citoplasma. La cantidad de inclusiones citoplasmáticas aumentó, en la parte más externa del citoplasma se pudo apreciar los alvéolos corticales; las inclusiones lipídicas fueron más abundantes, localizándose en la parte media del oocito (Figura 14A). Junto con estas inclusiones se encontraron los gránulos de vitelo, caracterizadas por su forma a manera de vesículas esféricas con un diámetro promedio de  $5.53 \pm 0.96 \mu\text{m}$ .

Tanto en la coloración con hematoxilina-eosina y la tricrómica de Mallory los gránulos de vitelo presentaron fuerte afinidad por los colorantes ácidos. La zona pelúcida también aumento en grosor ( $3.42 \pm 0.39 \mu\text{m}$ ), al igual que las células de la granulosa que se observaron como un epitelio cúbico ( $5.95 \pm 0.9 \mu\text{m}$ ), con núcleos en posición central; las células de la teca permanecieron como una capa de células alargadas y con núcleo en posición central (Figura 14B).

### **ESTADIO DE VITELOGÉNESIS AVANZADA.**

En el estadio de vitelogénesis avanzada incrementó en el tamaño del oocito alcanzando un diámetro promedio de  $357.36 \mu\text{m}$  ( $\pm 35.57 \mu\text{m}$ ). El diámetro del núcleo midió  $110.65 \mu\text{m}$  ( $\pm 13.46 \mu\text{m}$ ), se mantuvo en posición central, con forma irregular y material granular acumulado cerca de la membrana nuclear. Aún en este estadio se observó la zona de material basófilo alrededor del núcleo (Figura 15A).

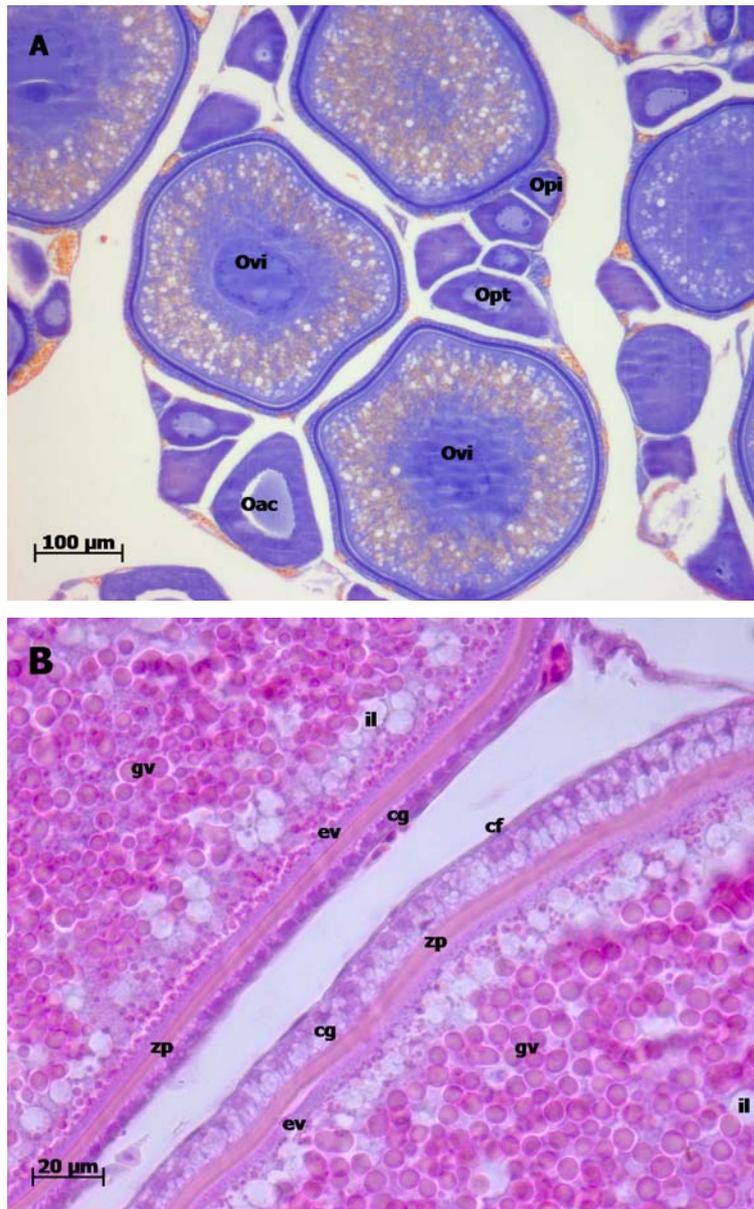


Figura 14. Microfotografía de oocitos en vitelogénesis inicial. A) Opi: oocitos perinúcleolares; Ovi: oocitos en vitelogénesis inicial. Técnica tricrómica de Mallory. B) Detalle de oocitos en vitelogénesis inicial: gv: gránulos de vitelo; il: inclusiones lipídicas; cg: células de la granulosa; cf: células foliculares; zp: zona pelúcida; ev: envoltura vitelina. Técnica hematoxilina-eosina. Aumentos 100 y 400 X.

Las inclusiones citoplasmáticas también presentaron algunos cambios: los alvéolos corticales fueron difíciles de observar; en cambio las inclusiones lipídicas fueron más abundantes y se encontraron distribuidas por todo el ooplasma, localizándose inclusiones más pequeñas cercanas a la zona pelúcida. En la región cercana al núcleo las inclusiones lipídicas se encontraron formando algunas inclusiones o vesículas de mayor tamaño (Figura 15B). Los gránulos de vitelo ocuparon la mayor parte del ooplasma, mantuvieron su forma esférica,

aumentando su diámetro ( $6.31 \pm 0.93 \mu\text{m}$ ) y conservando su afinidad por los colorantes ácidos. La zona pelúcida incrementó su grosor a  $4.19 \pm 0.35 \mu\text{m}$ . Las células de la granulosa incrementaron su altura ( $11.58 \pm 1.74 \mu\text{m}$ ), observándose los núcleos en posición central. El citoplasma de estas células presento poca afinidad a los colorantes, coloreándose solo los núcleos. Las células de la teca permanecieron sin cambios en su forma y tamaño.

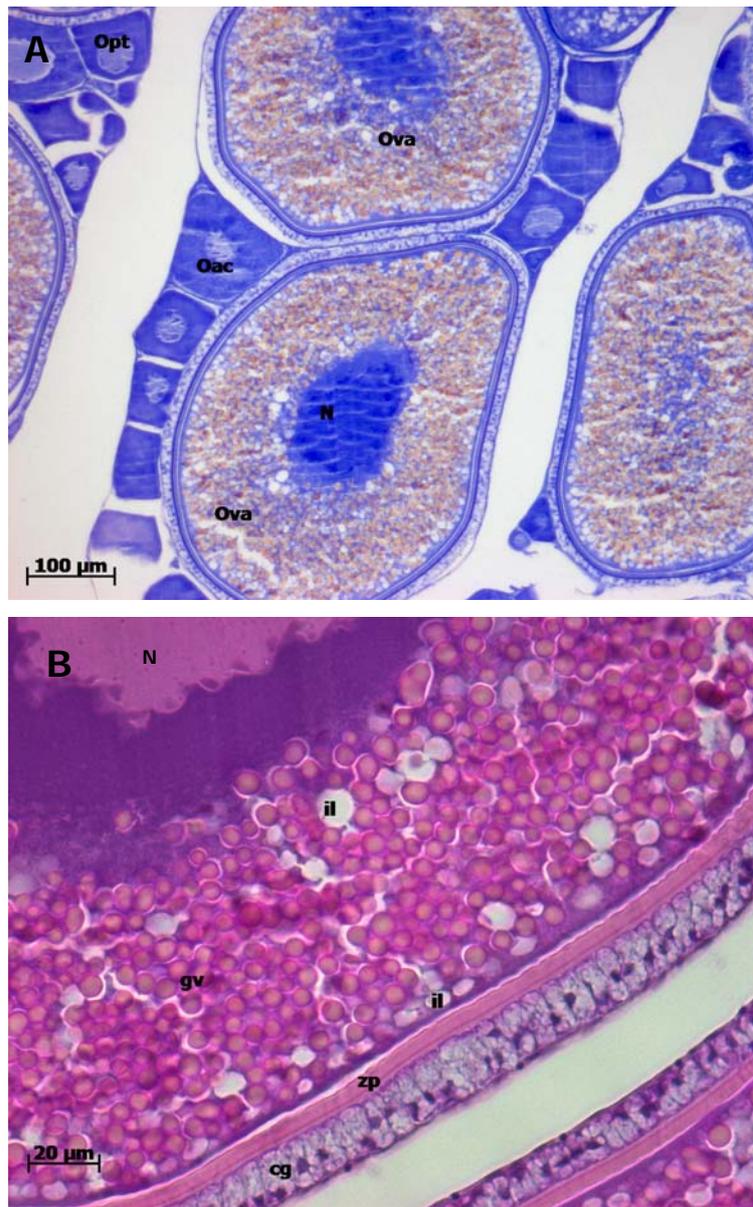


Figura 15. Microfotografía de oocitos en estadio de vitelogénesis avanzada. Opt: oocito perinúcleolar terminal; Oac: oocito en alvéolos corticales; Ova: oocitos en vitelogénesis avanzada. B) Detalle de oocito en vitelogénesis avanzada. N: núcleo; il: inclusiones lipídicas; gv: gránulos de vitelo; zp: zona pelúcida; cg: células de la granulosa. Técnica tricrómica de Mallory. Aumento 100 y 400 X.

### ESTADIO DE OOCITOS CON CÉLULAS DE LA GRANULOSA COLUMNARES.

Este estadio se denominó de células de la granulosa columnares por el notable incremento en la altura de dichas células, las cuales en este estadio constituyeron un epitelio columnar (Figura 16). El oocito incrementó su diámetro, mientras que el núcleo no presentó cambios respecto al estadio anterior. El espacio citoplasmático se encontró ocupado en su totalidad por los diferentes tipos de inclusiones. Los alvéolos corticales fueron difíciles de observar por la cantidad de material acumulado al interior del oocito; las inclusiones lipídicas se localizaron cerca de la zona pelúcida y del núcleo, estas últimas formaron vesículas de mayor tamaño que se ubicaron en la zona de material basófilo que rodeaba al núcleo. Los gránulos de vitelo se encontraron distribuidos por todo el espacio citoplasmático. A una amplificación de 1000 aumentos fue posible distinguir tres diferentes tipos de gránulos de vitelo: los gránulos más grandes presentaron una coloración más fuerte mientras que en los otros dos tipos la coloración fue más débil conforme se reducía el tamaño de los gránulos.

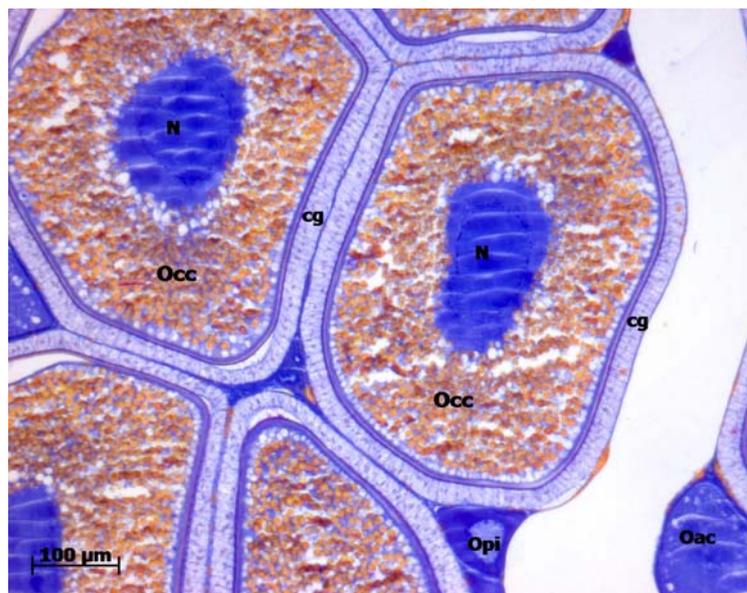


Figura 16. Microfotografía de oocitos en estadio de células de la granulosa columnares. Opi: oocito perinucleolar inicial; Oac: oocito con alvéolos corticales, Occ: oocitos con células de la granulosa columnares; cg: células de la granulosa; N: núcleos. Técnica tricrómica de Mallory. Aumento 100 X.

La zona pelúcida alcanzó un grosor de  $4.29 \mu\text{m}$  ( $\pm 0.42 \mu\text{m}$ ) notándose las estrías transversales. Entre el lado interno de la zona pelúcida y el ooplasma se observó una banda de material granular que corresponde a la envoltura vitelina y que fue más evidente que en estadios anteriores. Las células de la granulosa presentaron una longitud de  $19.13 \mu\text{m}$  ( $\pm 2.39 \mu\text{m}$ ). Con la coloración tricrómica de Mallory se pudo apreciar en estas células la

acumulación de material que presentó una coloración similar a la de los gránulos de vitelo más pequeños (Figura 17). Las células de la teca permanecieron sin cambios en su grosor.

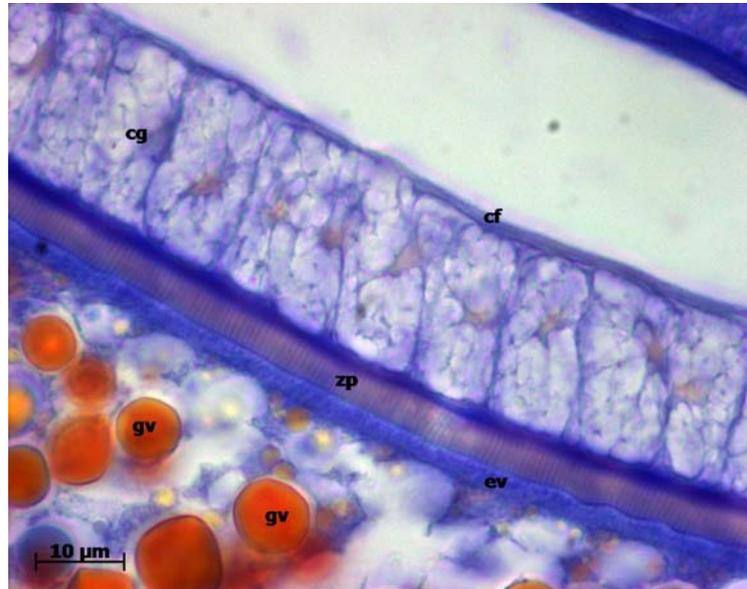


Figura 17. Microfotografía de oocito en estadio de células de la granulosa columnares. Se pueden apreciar las células de la granulosa (cg) y las células foliculares (cf); la zona pelúcida estriada (zp); la envoltura vitelina (ev) y los gránulos de vitelo de diferentes tamaños (gv). Técnica tricrómica de Mallory. Aumento 1000 X.

### 2.3. MADURACIÓN.

En esta última fase de crecimiento se presentaron cambios en la organización interna del oocito, las más notables fueron la modificación de las inclusiones citoplasmáticas, la capa de células de la granulosa, la transformación del núcleo y de los gránulos de vitelo, cada una de las cuales constituyó un estadio diferente en esta fase.

**ESTADIO DE OOCITOS EN PROTEÓLISIS.** El cambio más característico que se presentó en este estadio fue la fusión de las inclusiones lipídicas en vacuolas de un tamaño mayor que se acumularon cerca del núcleo, que invadieron de manera gradual la región del material basófilo que rodeaba al núcleo. El núcleo todavía se encontraba en posición central y en su interior se presentó material compacto localizado próximo a la membrana nuclear. Conforme se dio la acumulación de las vesículas de lípidos el núcleo adquirió un aspecto estrellado, debido a que las vesículas se encontraban cerca de la membrana nuclear (Figura 18A). La formación total de la gota de aceite ocurrió en el estadio siguiente después de completarse la migración nuclear. Cerca de la envoltura vitelina se pudieron observar algunos precursores de alvéolos corticales; por su parte los gránulos de vitelo no presentaron cambios evidentes

distinguiéndose los tres tipos diferentes de gránulos observados en el estadio de vitelogénesis avanzada.

La zona pelúcida incrementó su espesor a  $5.56 \mu\text{m}$  ( $\pm 0.31 \mu\text{m}$ ); las células de la granulosa aumentaron su altura a  $28.48 \mu\text{m}$  ( $\pm 5.96 \mu\text{m}$ ), mientras que las células de la teca permanecieron como una capa de células planas (Figura 18B).

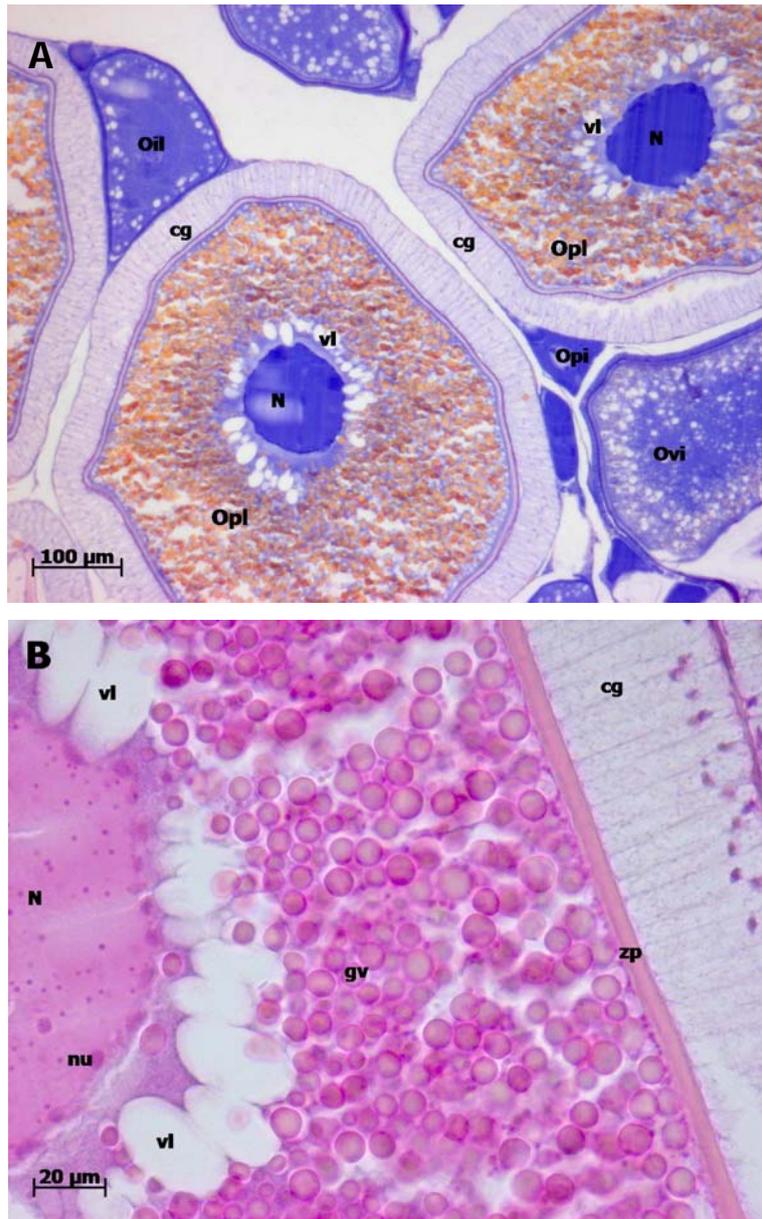


Figura 18. Microfotografía de oocitos en estadio de proteólisis. A) Opi: oocito perinúcleolar inicial; Oil: oocito en inclusiones lipídicas; Ovi: oocitos en vitelogénesis inicial; Opl: oocitos en proteólisis. Técnica tricrómica de Mallory. B) Detalle de oocito en proteólisis: N: núcleo; nu: nucleolos; vl: vesículas de lípidos; gv: gránulos de vitelo; zp: zona pelúcida; cg: células de la granulosa. Técnica hematoxilina-eosina. Aumento 100 y 400 X.

**ESTADIO DE OOCITOS CON NÚCLEO MIGRATORIO.** Después de iniciarse la acumulación de las vesículas de lípidos alrededor del núcleo estas comenzaron a ubicarse hacia un polo del oocito, desplazando al núcleo de su posición central (Figura 19). En las primeras etapas de la migración nuclear las vesículas de lípidos aún no han terminado de fusionarse para formar la gota de aceite. Se pudo observar que entre las vesículas y el núcleo se observó una zona de material basófilo al centro del oocito mientras el núcleo se desplazaba. Este último adquirió una forma ovalada y en el núcleoplasma se observó material granular.

En estados más avanzados de la migración nuclear las vesículas de lípidos se fusionaron por completo, observándose como un espacio vacío rodeado de una zona de material basófilo en el centro del oocito. En esta etapa el núcleo mostró una zona de material basófilo excéntrico. La migración nuclear finalizó cuando el material del núcleo se localizó en el polo animal del oocito. Al final de este estadio se observaron que algunos gránulos de vitelo fraccionados, lo cual fue indicativo del inicio de la hidratación del oocito. Las células columnares granulosa alcanzaron una altura de  $30.65 \mu\text{m}$  ( $\pm 4.25 \mu\text{m}$ ). Las demás estructuras alrededor del oocito permanecieron sin cambios notables.

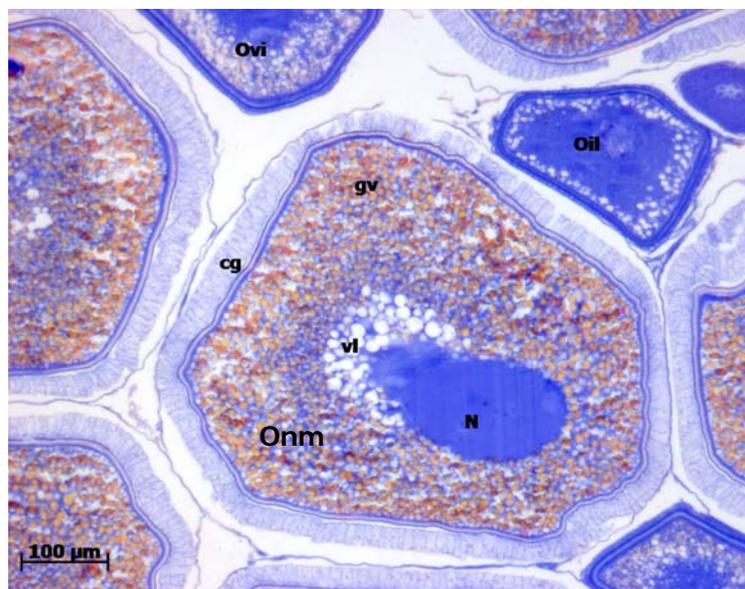


Figura 19. Microfotografía de oocito en estadio de núcleo migratorio. Onm: oocito con núcleo migratorio; Ovi: oocitos en vitelogénesis inicial; Oil: oocitos en inclusiones lipídicas; cg: células de la granulosa; gv: gránulos de vitelo; vl: vesículas de lípidos; N: núcleo. Técnica tricrómica de Mallory. Aumento 100 X.

**ESTADIO DE OOCITOS EN HIDRATACIÓN.** El proceso de hidratación del oocito se inició con el rompimiento de los gránulos de vitelo. En este estadio el oocito mostró zonas en el ooplasma, principalmente en el lado opuesto al núcleo que aún estaba en migración al polo animal, en donde los gránulos de vitelo fracturados comenzaron a fusionarse formando vesículas de vitelo más grandes (Figura 20). Conforme se dio la fusión de los gránulos de vitelo se observaron dos diferentes tipos de compuestos al interior del oocito, uno con afinidad a los colorantes ácidos y que correspondió al vitelo líquido y otro de afinidad basófila que se encontró distribuido entre las vesículas del vitelo líquido. A mayor aumento se observaron los gránulos fracturados e inclusiones lipídicas fusionándose para formar la gota de aceite (Figura 21A).

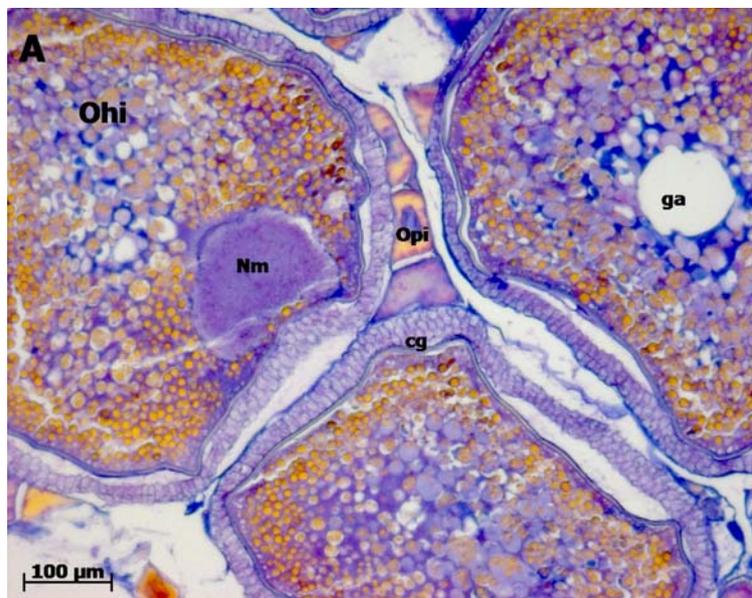


Figura 20. Microfotografía de oocitos en hidratación inicial. A) Oocitos en hidratación inicial. Se puede observar el núcleo migratorio (Nm) y la gota de lípidos (ga) que ocupa el centro del oocito. Técnica tricrómica de Mallory. Aumento 100 X.

Al final de la hidratación el oocito se observó como una estructura de forma irregular debido a que durante el proceso histológico se eliminó el agua contenida en el interior del oocito por el uso de solventes utilizado para la inclusión en parafina. En los cortes histológicos se pudo distinguir el polo animal y la gota de aceite completamente formada. El vitelo se encontró licuado en su totalidad, manteniéndose los dos tipos de compuestos separados (Figura 21B). En las células de la granulosa se pudieron observar los núcleos en posición distal con respecto a la zona pelúcida, las foliculares se encontraron mantuvieron su morfología. La zona pelúcida se encontró distendida por la acumulación de líquidos al interior del oocito.

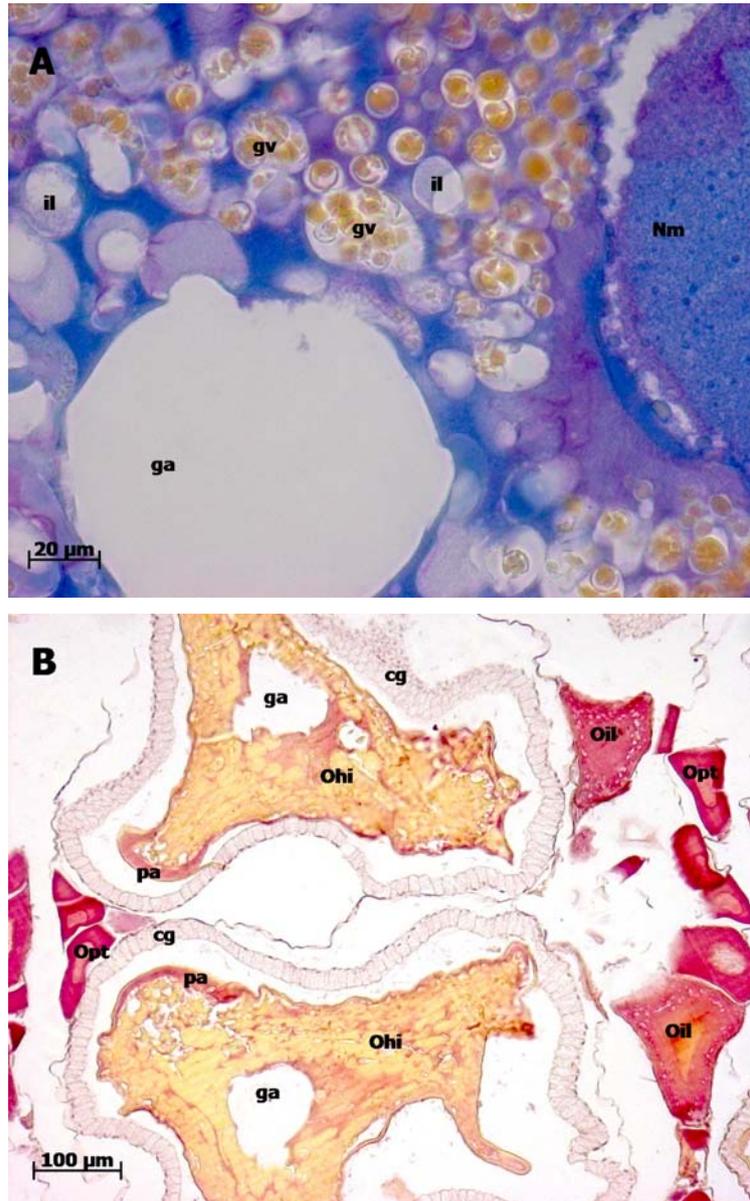


Figura 21. A) Detalle de oocito en hidratación inicial con los gránulos de vitelo fragmentados. Técnica tricrómica de Mallory. B) Oocitos en hidratación avanzada. Se observa el vitelo fusionado, la gota de aceite y el polo animal. Técnica de Van Gieson. Ohi: oocitos hidratados; Nm: núcleo migratorio; Opt: oocito perinucleolar terminal; Oil: oocitos en inclusiones lipídicas; ga: gota de aceite; il: inclusiones lipídicas; gv: gránulos de vitelo cg: células de la granulosa, pa: polo animal. Aumento 400 y 100 X.

#### 2.4. ATRESIA FOLICULAR.

Durante el análisis histológico de las muestras obtenidas en las diferentes temporadas reproductivas se detectó la presencia de oocitos atrésicos o en degeneración. Dichas estructuras se presentaron en diferentes estadios de desarrollo del oocito, observándose desde algunas atresias ocasionales hasta lo que se denominó como atresia folicular masiva en la cual se presentaron oocitos atrésicos en una cantidad considerable y en diferentes

estadios de desarrollo en el mismo ovario. En el presente trabajo solo se hizo el seguimiento de las atresias de tipo  $\alpha$  y  $\beta$  como indicadores de alteraciones en el proceso de maduración del ovario cuando se presentaron de forma masiva en el ovario. Los dos tipos de atresia se observaron por lo general en los estadios de oocitos perinúcleolares, de vitelogénesis y en algunos casos en el estadio de células de la granulosa columnares.

Las atresias  $\alpha$  y  $\beta$  en estadio de oocitos perinúcleolares o atresias sin vitelo se caracterizaron por la ausencia de los núcleos y nucléolos de los oocitos debido a la lisis provocada por el proceso de reabsorción (Figura 22A). En el inicio de la reabsorción por atresia se observó que las células de la granulosa invadían el interior del oocito, el cual presentaba ooplasma de aspecto granular y sin núcleo, conservándose un tamaño similar al del oocito normal. Al entrar en atresia  $\beta$  el oocito en reabsorción disminuyó en tamaño, se hizo más evidente la hipertrofia de las células de la granulosa y en el ooplasma se pudieron observar algunas vacuolas y núcleos picnóticos (22B).

Las atresias  $\alpha$  en estadios de vitelogénesis y células de la granulosa columnares se pudieron identificar en estadios muy tempranos (22C). La ruptura de la zona pelúcida fue el primer indicador de la reabsorción del oocito. En esta etapa de la atresia las células de la granulosa presentaron un aspecto normal al igual que los gránulos de vitelo y aun se pudo observar el núcleo. En las atresias más avanzadas fue más evidente la fragmentación de la zona pelúcida y la hipertrofia de las células de la granulosa, estas invadieron el interior del oocito a través de los espacios de la zona pelúcida, también fue notable la ausencia del núcleo (22D). La reabsorción de los gránulos de vitelo inició de la periferia hacia el interior del oocito, presentaron el aspecto de una sustancia amorfa y de afinidad acidófila. Se consideraron como  $\alpha$  a este tipo de atresias cuando todavía pudieron distinguirse restos de gránulos de vitelo en el oocito.

Las atresias  $\beta$  con vitelo se caracterizaron por la completa desintegración de los gránulos de vitelo, acompañados de una cantidad considerable de núcleos picnóticos, provenientes de las células foliculares, afectándose toda la estructura de la atresia además de una disminución considerable de su tamaño. En esta etapa la coloración de la atresia fue basófila (Figura 22C).

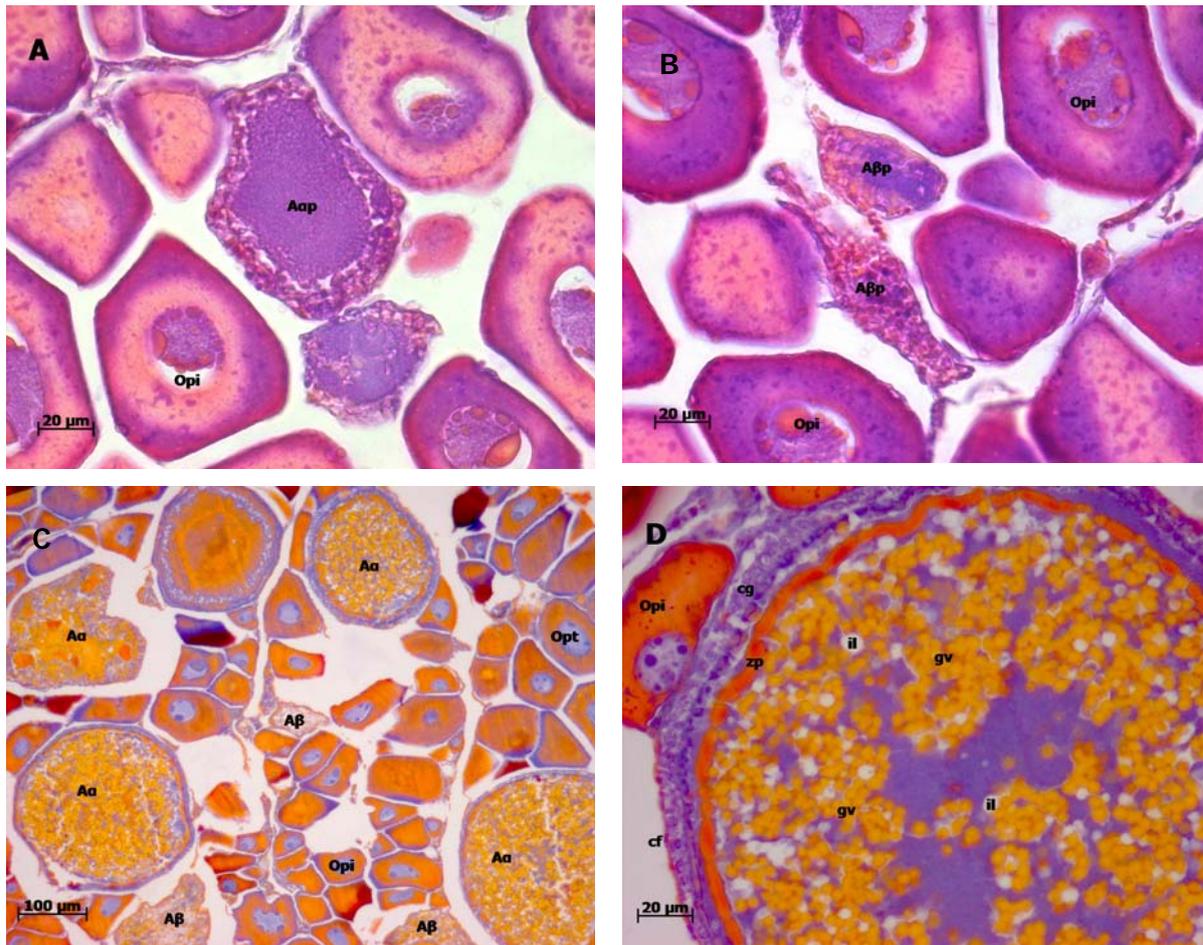


Figura 21. Microfotografía de oocitos en atresia. A) Oocitos perinucleolares en atresia  $\alpha$  sin vitelo. B) Oocitos perinucleolares en atresia  $\beta$  sin vitelo. C) Oocitos en vitelogénesis avanzada con atresia  $\alpha$  ( $A\alpha$ ) en diferentes etapas y atresias beta ( $A\beta$ ) con vitelos. D) Oocito en atresia  $\alpha$ . Se observan las células de la granulosa (cg), la zona pelúcida fragmentada (zp), gránulos de vitelo (gv), inclusiones lipídicas (il) y las células foliculares (cf). Opi: oocitos perinucleolares iniciales; Opt: oocitos perinucleolares terminales. Técnica tricrómica de Mallory. Aumento A, B y D 400 X, C 100 X.

## 2.5. FOLÍCULOS POSTOVULATORIOS.

Los folículos postovulatorios del día 1 (PO1) fueron estructuras conformadas por las células foliculares que rodeaban al oocito, presentaron la forma de un cordón continuo de células plegadas con un lumen en el cual se encontraba el oocito(23A). En la etapa temprana es posible distinguir células de la granulosa individuales de aspecto cúbico con núcleo en posición central. En la etapa más avanzada las células individuales son escasas, la mayor parte de las células parecen fusionadas presentando núcleos separados. En la figura 23B se observa un PO1 avanzado, en el que la mayor parte de las células se encuentran fusionadas y comienzan a aparecer algunas vesículas a lo largo del cordón.

En los folículos postovulatorios del día 2 (PO2) fue notable una disminución considerable de tamaño, al igual que el lumen interno. El cordón de células se observó más plegado, formándose una estructura continua en donde el cambio más notable fue la presencia de abundantes núcleos picnóticos y algunos núcleos en cariorrexis. También se observaron vacuolas más grandes y una capilarización abundante alrededor del PO (figura 23 C). En la etapa más avanzada de los PO2 no fue posible distinguir individualidad celular, el lumen interno fue más reducido y se mantuvo la presencia de los núcleos picnóticos.

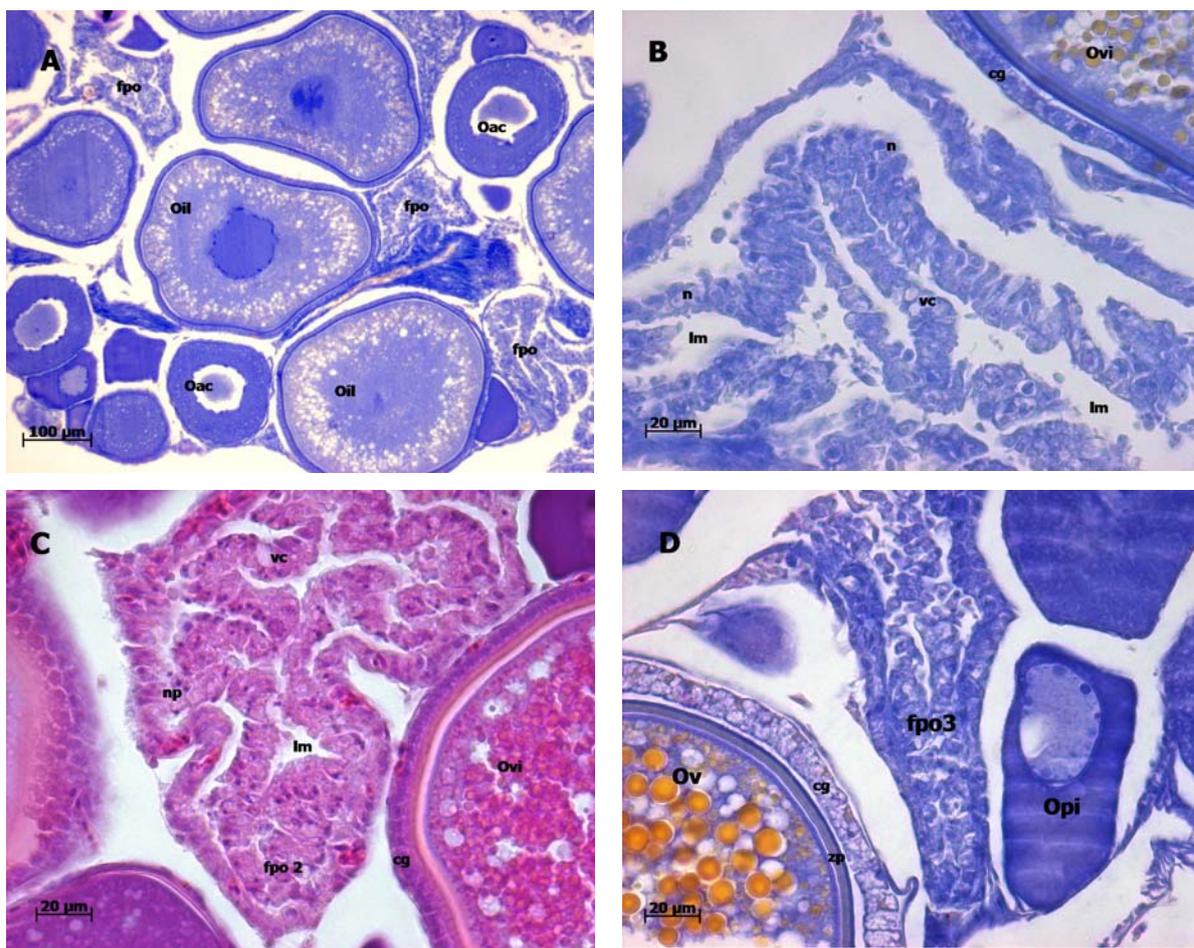


Figura 23. Microfotografías de diferentes etapas de folículos postovulatorios. A) Fpo2 con oocitos en inclusiones lipídicas (Oil) y alvéolos corticales (Oac). Se observan las diferencias de tamaño y forma conforme aumenta la edad del fpo: B) Detalle de folículo postovulatorio 1, C) folículo postovulatorio 2 (fpo2) y D) folículo postovulatorio 3 (fpo3). n: núcleos; np; núcleos picnóticos; vc: vacuolas; lm: lumen; cg: células de la granulosa; zp: zona pelúcida; Ovi: oocito vitelogénico inicial; Ova: oocito vitelogénico avanzado. A, B y D técnica tricrómica de Mallory; D técnica de hematoxilina-eosina. Aumento A 100 X, B, C y D 400 X.

En los folículos postovulatorios de día 3 (PO3) la estructura ha reducido su tamaño de forma considerable en comparación con los PO anteriores. En la etapa temprana del PO3, el lumen ya no fue tan definido, se mantuvieron algunos núcleos picnóticos y vacuolas escasas. Alrededor del folículo se formó una capa de tejido fibroso. En su etapa final el PO3 presentó una estructura fibrosa, sin lumen interno, haciéndose evidente su reintegración al resto del tejido ovárico ya que estas estructuras se encontraron unidas a las paredes del estroma (Figura 23 D). La estructura morfológica de un PO3 puede llegar a confundirse con atresias alfa sin vitelo.

### **3. INCIDENCIA DE ESTADIOS DE DESARROLLO MÁS AVANZADO.**

En 2003 fue consistente la presencia de los diferentes estadios de desarrollo del oocito, se presentó el mismo patrón en los tres meses de muestreo (figura 24). Se encontró que el mayor porcentaje de hembras presentó en sus ovarios los estadios de menor desarrollo del oocito a lo largo de esta temporada reproductiva. En febrero el 75% de las hembras colectadas presentaron ovarios con oocitos en estadio perinúcleolar, mientras que el máximo estadio de desarrollo observado fue el de vitelogénesis avanzada, presente en solo el 4.2% de las hembras. Al final de la temporada reproductiva, en abril, se observaron estadios de desarrollo más avanzados, encontrándose el estadio de proteólisis en el 4.7% de las hembras recolectadas en ese mes. Sin embargo el 32.8% de las hembras presentaron atresia folicular masiva (figura 24). La incidencia de folículos postovulatorios (PO) fue baja en esta temporada: en enero 4.2% y en abril 3.1%.

El muestreo de la temporada reproductiva del 2004 se inició en febrero. No se registraron estadios tempranos de desarrollo del oocito, las hembras en vitelogénesis inicial representaron el 32.4% de los ejemplares colectados. El siguiente grupo mas abundante correspondió a hembras con oocitos en células granulosa columnares (29.4%). El grupo menos abundante fue el de oocitos en el estadio de núcleo migratorio que solo se presentó en el 5.9% de las hembras. Durante este mes se registró un 67.7% de hembras que presentaron PO, sin registrarse la presencia de atresias en todos los ovarios analizados.

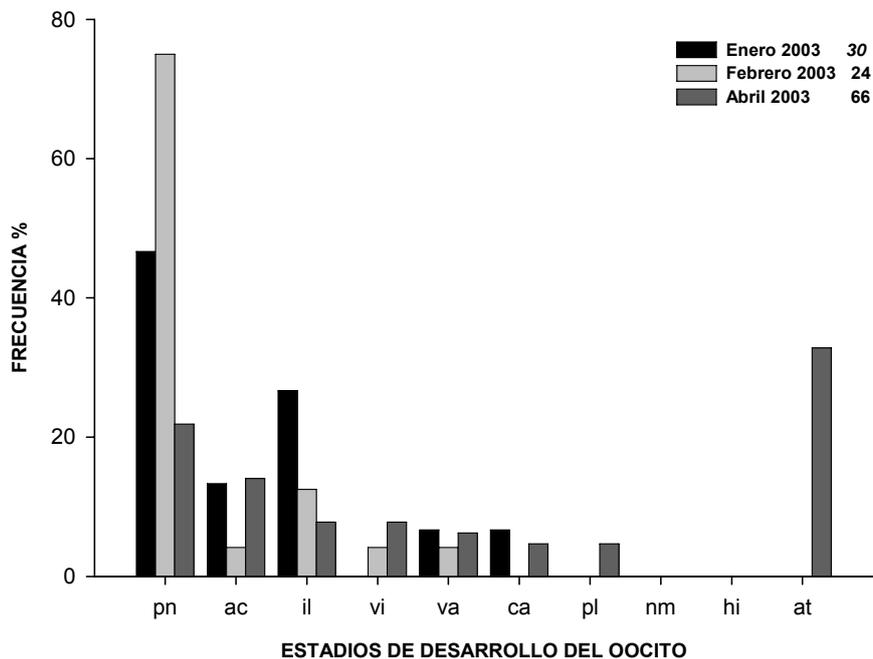


Figura 24. Frecuencia de hembras en los diferentes estadios de desarrollo del oocito para la temporada reproductiva de 2003. El número en cada mes representa el número de hembras colectadas. pn: perinúcleolares; ac: alvéolos corticales; il: inclusiones lipídicas; vi: vitelogénesis inicial; va: vitelogénesis avanzada; ca: células de la granulosa columnares; pl: proteólisis; nm: núcleo migratorio; hi: hidratación; at: atresia mayor.

Para marzo se observó una alta incidencia en los estadios intermedios de desarrollo del oocito. Las hembras en proceso de vitelogénesis fueron las más abundantes con el 35.9%, siguiéndole en proporción las hembras cuyos oocitos presentaban células granulosas columnares con el 27.2%. El estadio de desarrollo más avanzado registrado en el análisis histológico fue el de oocitos en núcleo migratorio que se presentó solo en el 3.5% de las hembras. En diciembre hubo una mayor incidencia de hembras que contenían oocitos en los primeros estadios de desarrollo. La incidencia más alta fue en hembras con oocitos en estadio de inclusiones lipídicas (41.1%), registrándose estadios tan avanzados como células de la granulosa columnares (1.6%). Los folículos postovulatorios fueron observados en el 30.7% de las hembras, mientras que la atresia masiva se encontró en el 2.4% de hembras que se encontraban en el estadio de oocitos en inclusiones lipídicas (figura 25).

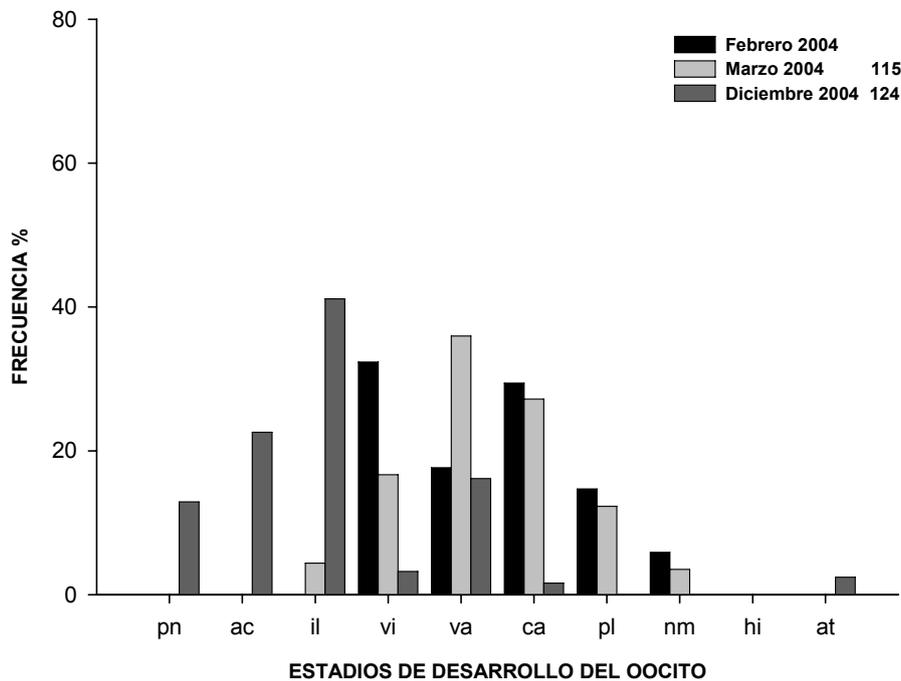


Figura 25. Frecuencia de hembras en los diferentes estadios de desarrollo del oocito para la temporada reproductiva de 2004. El número en cada mes representa el número de hembras colectadas. pn: perinúcleolares; ac: alvéolos corticales; il: inclusiones lipídicas; vi: vitelogénesis inicial; va: vitelogénesis avanzada; ca: células de la granulosa columnares; pl: proteólisis; nm: núcleo migratorio; hi: hidratación; at: atresia mayor.

En diciembre de 2004 la incidencia de estadios de desarrollo fue muy similar a la de enero de 2005, en donde también se encontró una mayor incidencia de hembras con estadios de inclusiones lipídicas y vitelogénesis inicial, con 24.4% en cada uno, mientras que el estadio de desarrollo más avanzado que se registró fue el de oocitos en células de la granulosa columnares en el 17 % de las hembras, más alta que en el mes anterior. En este caso no se registró la incidencia de atresia masiva.

En marzo la presencia de estadios de desarrollo iniciales fue nula. El estadio mas temprano que se registró fue el de vitelogénesis inicial (15%). La mayor parte de las hembras se encontraban en vitelogénesis avanzada (40.4%) y células de la granulosa columnares (28%). En este mes también se registraron los estadios de proteólisis, núcleo migratorio e hidratación aunque en una proporción baja, siendo el más abundante el estadio de núcleo migratorio con el 5.3%. La presencia de atresia masiva también se registro en el 5.3% de las hembras, la cual ocurrió en hembras en estadios de vitelogénesis (figura 26).

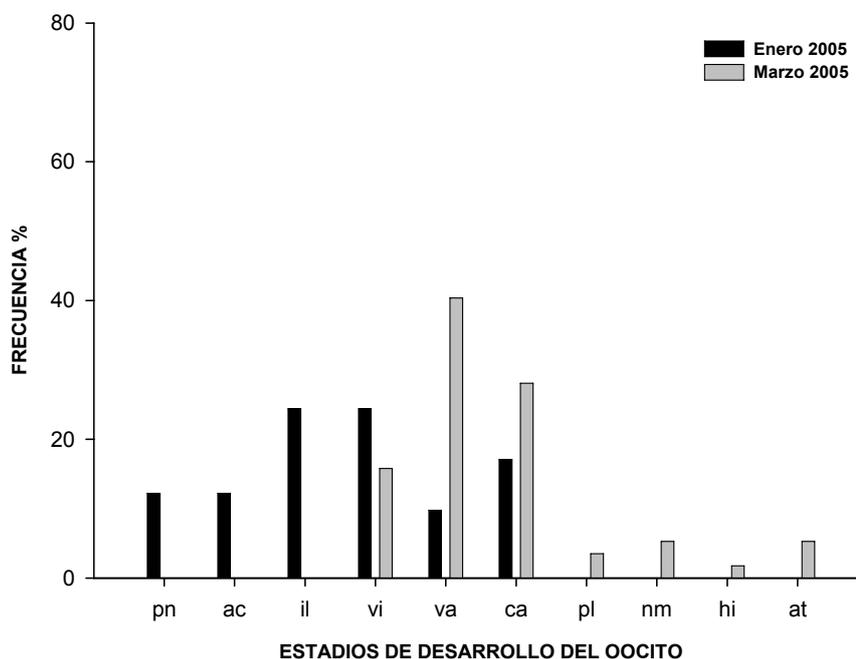


Figura 26. Frecuencia de hembras en los diferentes estadios de desarrollo del oocito para la temporada reproductiva de 2005. El número en cada mes representa el número de hembras colectadas. pn: perinúcleolares; ac: alvéolos corticales; il: inclusiones lipídicas; vi: vitelogénesis inicial; va: vitelogénesis avanzada; ca: células de la granulosa columnares; pl: proteólisis; nm: núcleo migratorio; hi: hidratación; at: atresia mayor.

En 2006 solo se obtuvieron muestras en febrero (figura 27). Sin embargo fue en este mes cuando se encontraron en los ovarios todos los estadios de desarrollo de los oocitos. En la Figura 26 se muestra el porcentaje de incidencia de los diferentes estadios. El estadio de desarrollo temprano más abundante fue el de oocitos en inclusiones lipídicas (14.7%); en la vitelogénesis inicial la proporción de hembras descendió (4.5%) y aumentó en los estadios de oocitos en vitelogénesis avanzada (22%) y con células granulosas columnares (20.3%) donde se encontraba la mayor proporción de las hembras. En este mes también fue posible observar hembras con oocitos en hidratación, las cuales representaron el 8.5%. Las hembras que en sus ovarios presentaron folículos postovulatorios también fue alta (20.9%), lo cual fue un indicador y evidencia de la puesta activa. Las hembras que presentaron atresia fueron escasas, solo el 1.1% presentó atresia masiva que ocurrió en los estadios de vitelogénesis inicial y avanzada.

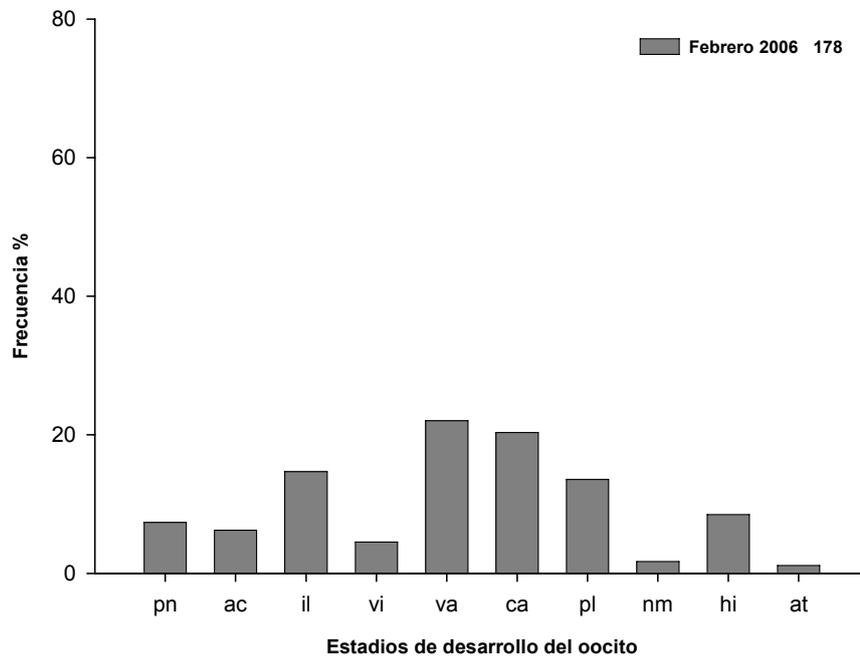


Figura 27. Frecuencia de hembras en los diferentes estadios de desarrollo del oocito en febrero de 2006. El número en el mes representa el número de hembras colectadas. pn: perinúcleolares; ac: alvéolos corticales; il: inclusiones lipídicas; vi: vitelogénesis inicial; va: vitelogénesis avanzada; ca: células de la granulosa columnares; pl: proteólisis; nm: núcleo migratorio; hi: hidratación; at: atresia mayor.

## 4. CUANTIFICACIONES DE ESTRADIOL Y CALCIO EN SUERO SANGUÍNEO.

### 4.1. NIVELES DE ESTRADIOL EN SUERO SANGUÍNEO.

La cantidad de hembras de las cuales se obtuvo muestra de sangre para el análisis de E<sub>2</sub> se presenta en la Tabla 10. El número de ejemplares varió entre las diferentes temporadas reproductivas. Sin embargo, se pudieron obtener muestras de los meses que se consideran de mayor actividad reproductiva, febrero y marzo, y de principio y fin de la temporada reproductiva, diciembre y abril. Con esto se pudo obtener información de los perfiles hormonales en diferentes momentos de la temporada reproductiva.

Tabla 10. Relación de los lances de pesca comercial obtenidos durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006 y el número de hembras de los que se obtuvo muestra de sangre para las cuantificaciones de estradiol en suero sanguíneo.

FECHA	No DE LANCES DE PESCA	No DE EJEMPLARES
ENERO 2003	1	2
FEBRERO 2003	1	8
ABRIL 2003	2	16
FEBRERO 2004	1	6
MARZO 2004	4	44
DICIEMBRE 2004	3	31
ENERO 2005	1	21
MARZO 2005	2	9
FEBRERO 2006	4	17

En la Figura 28 se presentan los valores promedio mensuales de estradiol para cada temporada reproductiva. Se observaron diferencias significativas en los niveles de estradiol en suero sanguíneo, entre los meses de las diferentes temporadas reproductivas y entre temporadas (Tabla 11). En el 2003 los niveles mas bajos de E<sub>2</sub> se registraron en abril, al final de la temporada reproductiva con una concentración promedio de 30.75 pg·mL<sup>-1</sup> mientras que en enero el valor promedio fue de 423 pg·mL<sup>-1</sup>. En febrero el valor promedio de estradiol también fue bajo a pesar de considerarse el mes con mayor actividad reproductiva.

Para el 2004, febrero y marzo presentaron valores de E<sub>2</sub> mayores a los 620 pg·mL<sup>-1</sup>, presentándose una variación más amplia en marzo con respecto al valor promedio mensual al encontrarse hembras con concentraciones de E<sub>2</sub> que variaron desde los 69 hasta 2827 pg·mL<sup>-1</sup>. En diciembre el valor promedio fue de 134 pg·mL<sup>-1</sup> aunque ya se presentaban hembras con concentraciones de E<sub>2</sub> mayores a los 500 pg·mL<sup>-1</sup>. La tendencia para este mes fue hacia el incremento en las concentraciones de estradiol. En enero de 2005, el valor promedio fue de 477.8 pg·mL<sup>-1</sup>, presentándose también una tendencia hacia el incremento

en las concentraciones de estradiol en el suero sanguíneo. En marzo se observó un descenso en el valor promedio hasta  $197.9 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  sin mostrar una variación tan amplia en las concentraciones de estradiol. En febrero de 2006 se registro el valor promedio más alto,  $1088 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , con una amplia variación con respecto al valor promedio puesto que se presentaron concentraciones desde 218 hasta  $1996 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Tabla 11. Resumen del análisis de varianza de los niveles de  $E_2$  durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.

N	Promedio	Mínimo	Máximo	Desv estandar
154	447.4351	20.00000	2827.000	473.9831
SS	df	MS	F	p
181.1198	8	22.63997	44.99337	0.00

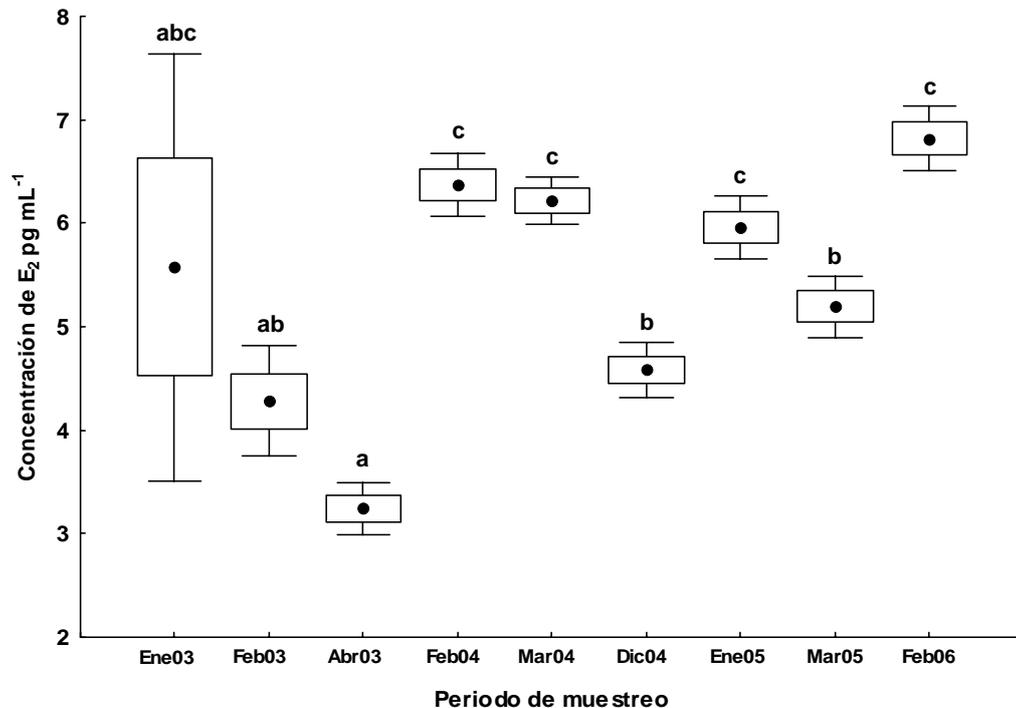


Figura 28. Valores promedio en las concentraciones de estradiol en suero sanguíneo durante las diferentes temporadas reproductivas. Los valores se presentan transformados a logaritmo natural. Se presenta el valor promedio, el error y la desviación estándar.

Al comparar los valores promedio entre los meses que se corresponden en las diferentes temporadas reproductivas se encontró que en enero del 2003 las muestras de 2 muestras presentaron valores individuales de  $E_2$  que correspondieron con los valores observados en enero de 2005 en hembras que presentaron estadios de desarrollo del oocito similares.

En el mes de febrero de las diferentes temporadas reproductivas se encontraron diferencias significativas en los valores promedio de  $E_2$ . Febrero de 2003 difirió con 2004 y 2006, mientras que entre estos dos últimos años no se observó diferencia significativa aun cuando los valores promedio resultaron distintos. En el caso de los meses de marzo de 2004 y 2005 también se presentaron diferencias significativas en las concentraciones de  $E_2$ . El valor promedio fue más alto en marzo de 2004, con una variación más amplia al presentarse hembras con concentraciones de  $E_2$  desde 69 hasta 2827  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , en marzo de 2005 las concentraciones de estradiol alcanzaron un valor máximo de 300  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

#### **4.1.1 NIVELES DE ESTRADIOL ASOCIADOS A LOS ESTADIOS DE DESARROLLO DEL OOCITO.**

En un análisis posterior se trataron de establecer los rangos en las concentraciones de  $E_2$  para cada uno de los estadios de desarrollo de los oocitos. Con este fin se agruparon a las hembras que presentaron el mismo estadio de desarrollo del oocito en sus ovarios, para cada una de las temporadas reproductivas (figura 29).

En la temporada reproductiva del 2003 los valores promedio de las concentraciones fueron bajas en todos los estadios de desarrollo. En los tres meses el análisis histológico demostró que se presentaron todos los estadios de desarrollo del oocito, incluida la presencia de atresia masiva en abril, sin embargo en todos ellos, al asociarlos con la concentración de  $E_2$ , se observó que el valor promedio por estadio no supero los 200  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , aun en estadios tan avanzados como el de células granulosas columnares, a excepción de la hembra de enero en el mismo estadio que tuvo una concentración de  $E_2$  de 754  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

En la temporada reproductiva del 2004, se observó en los meses de febrero y marzo una tendencia al incremento en las concentraciones de  $E_2$  conforme avanzaba el desarrollo de los oocitos. En marzo se observaron concentraciones bajas de  $E_2$  ( $> 300 \text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) en hembras en estadio de inclusiones lipídicas. A partir del estadio de vitelogénesis inicial se incrementaron las concentraciones de  $E_2$  en suero sanguíneo. Se observó que la concentración durante la vitelogénesis avanzada fue más alta en hembras que presentaron folículos postovulatorios. Las concentraciones en el estadio de células granulosas columnares presentaron valores promedio más altos para los dos meses, al pasar al estadio de proteólisis descendieron los valores promedio de estradiol hasta llegar los 500  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  en el estadio de núcleo migratorio.

Diciembre del 2004 fue el inicio de la temporada reproductiva del 2005, se observó la tendencia a incrementar las concentraciones de  $E_2$  junto con el crecimiento de los oocitos. En los estadios tempranos de crecimiento se encontraron concentraciones por debajo de los  $200 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A partir de la vitelogénesis inicial los valores aumentaron y llegaron hasta los  $345.6 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  en la vitelogénesis avanzada, que fue el estadio de desarrollo más avanzado registrado en diciembre. En enero de 2005, el incremento se observó a partir del estadio de inclusiones lipídicas, con un valor promedio arriba de los  $380 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  y alcanzando el valor máximo en la vitelogénesis inicial con un promedio de  $943 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Las concentraciones de  $E_2$  decrecieron y en el estadio de células granulosas columnares llegó a  $515.4 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . En marzo de 2005 se presentaron resultados diferentes a lo encontrado en los meses anteriores. Los estadios de desarrollo del oocito que se registraron fueron desde vitelogénesis inicial hasta el de células granulosas columnares y la presencia de atresia masiva, presentándose en todos los estadios concentraciones de  $E_2$  por debajo de los  $250 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

En febrero de 2006, se obtuvieron muestras de sangre de hembras que se encontraban en los estadios de vitelogénesis inicial con presencia de FPO, proteólisis e hidratación, se presentaron las concentraciones de  $E_2$  más altas observadas en las diferentes temporadas reproductivas. En este caso también se presentó la tendencia al incremento en las concentraciones de  $E_2$ , la cual fue más baja en la vitelogénesis inicial ( $1057.8 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), incrementando en el estadio de proteólisis ( $1261.5 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) para descender durante la hidratación a  $399 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

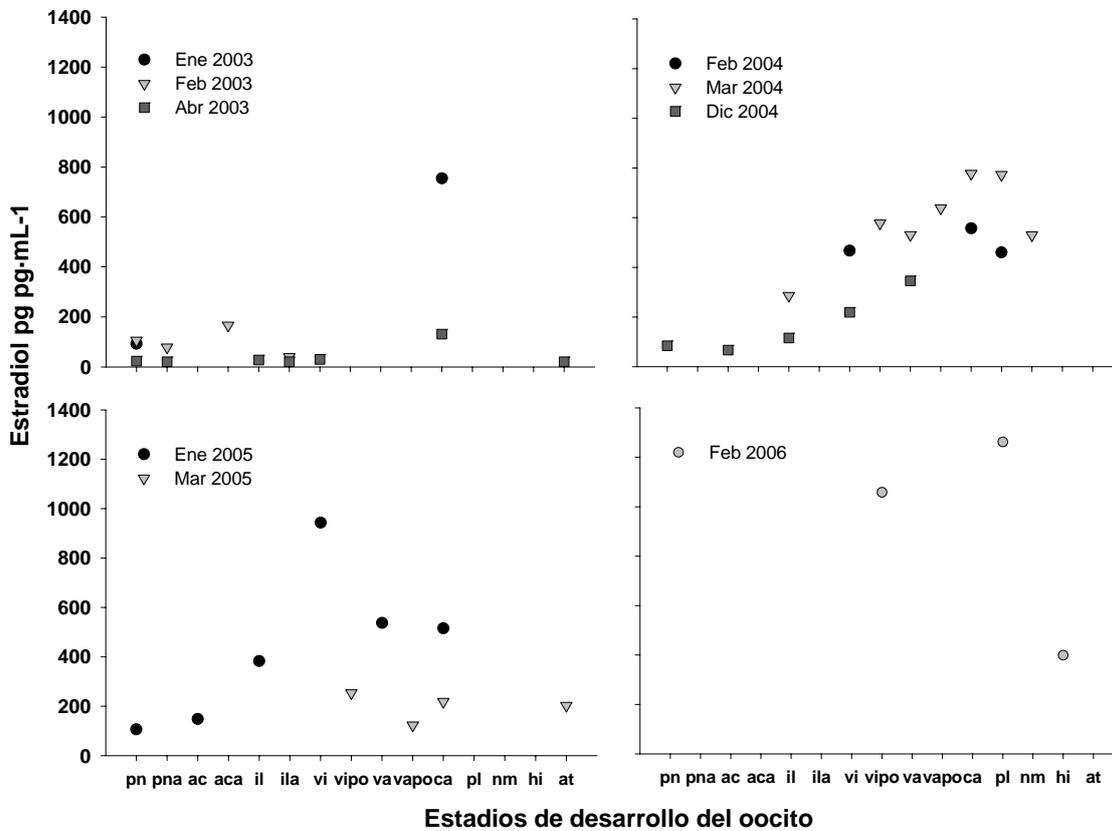


Figura 29. Variaciones en las concentraciones de estradiol por estadios de desarrollo del oocito en las diferentes temporadas reproductivas.

Aunque se observó que las concentraciones de  $E_2$  variaron en los mismos estadios de desarrollo para las diferentes temporadas reproductivas, se agruparon todos los ejemplares por estadio de desarrollo más avanzado de los oocitos. Un aspecto importante a resaltar es la presencia de los diferentes estadios de desarrollo presentes en los ovarios. Hasta el estadio de oocitos en vitelogénesis avanzada el estadio próximo anterior que se observó en el mismo ovario fue el de inclusiones lipídicas, mientras que en hembras que presentaron evidencias de un desove reciente por la presencia de FPO presentaron los estadios de vitelogénesis inicial y avanzada. En los estadios de células granulosas columnares, proteólisis, núcleo migratorio e hidratación se observó el estadio de vitelogénesis inicial en diferentes grados de desarrollo.

La tendencia observada fue hacia el incremento en las concentraciones de estradiol conforme el oocito avanzaba en los diferentes estadios de desarrollo (figura 30),

encontrándose diferencias significativas en las concentraciones de estradiol en diferentes estadios de desarrollo del oocito (Tabla 12). Del estadio de oocitos perinúcleolares hasta el estadio de alvéolos corticales las concentraciones no fueron mayores a los  $100 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A partir del estadio de inclusiones lipídicas se da un incremento en la concentración de  $E_2$ , con un valor promedio para este estadio de  $189.45 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , en un intervalo que varió desde los  $20 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  en hembras de abril de 2003 y diciembre de 2004, las cuales se encontraban al final y al inicio de las temporadas reproductivas, hasta los  $638 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  en ejemplares de enero de 2005.

En la vitelogénesis inicial y avanzada se observó que el valor promedio en la concentración de  $E_2$  fue de  $474.17$  y  $481.93 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  para cada estadio. Los valores de estradiol fueron más alto en las hembras con FPO, que en hembras en vitelogénesis inicial fue de  $531 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  y de  $721.05 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  para las de vitelogénesis avanzada. Se encontró que los valores bajos en las hembras en vitelogénesis que no presentaron FPO correspondieron a aquellas recolectadas al inicio de la temporada reproductiva (diciembre) y los valores más altos a hembras de los meses de mayor actividad reproductiva (enero a marzo), con un intervalo que fue desde los  $20$  hasta los  $1093 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Las hembras en vitelogénesis que presentaron FPO se encontraron en febrero y marzo, los intervalos que se presentaron en estas hembras fueron ligeramente mayores, desde los  $115$  hasta los  $1996 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

En el estadio de células granulosas columnares el valor promedio ( $600.71 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) fue mayor que en las hembras en vitelogénesis inicial, inicial con FPO y avanzada pero menor que en las hembras en vitelogénesis avanzada con FPO. Los valores observados en el estadio de células granulosas fueron desde los  $120$  hasta  $2827 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Al pasar al estadio de proteólisis el valor promedio en la concentración de estradiol alcanzó el máximo con  $1028.06 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . La variación en las concentraciones de  $E_2$  en este estadio fue desde los  $218$  hasta los  $1821 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Al entrar en los estadios finales de maduración los niveles de estradiol decrecieron, hasta llegar a  $399 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  en el estadio de hidratación. En el caso de la atresia masiva el valor promedio de estradiol fue de  $136.5 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , el valor más alto fue de  $300 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  en atresia masiva en vitelogénesis avanzada y el mínimo fue de  $20 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  en atresia masiva en perinúcleolares.

Tabla 12. Resumen del análisis de varianza de los niveles de E<sub>2</sub> asociado a los diferentes estadios de desarrollo de los oocitos.

N	Promedio	Mínimo	Máximo	Desv estandar
152	5.445228	2.995732	7.946971	1.295144
SS	df	MS	F	p
146.9495	12	12.24579	16.00719	0.000000

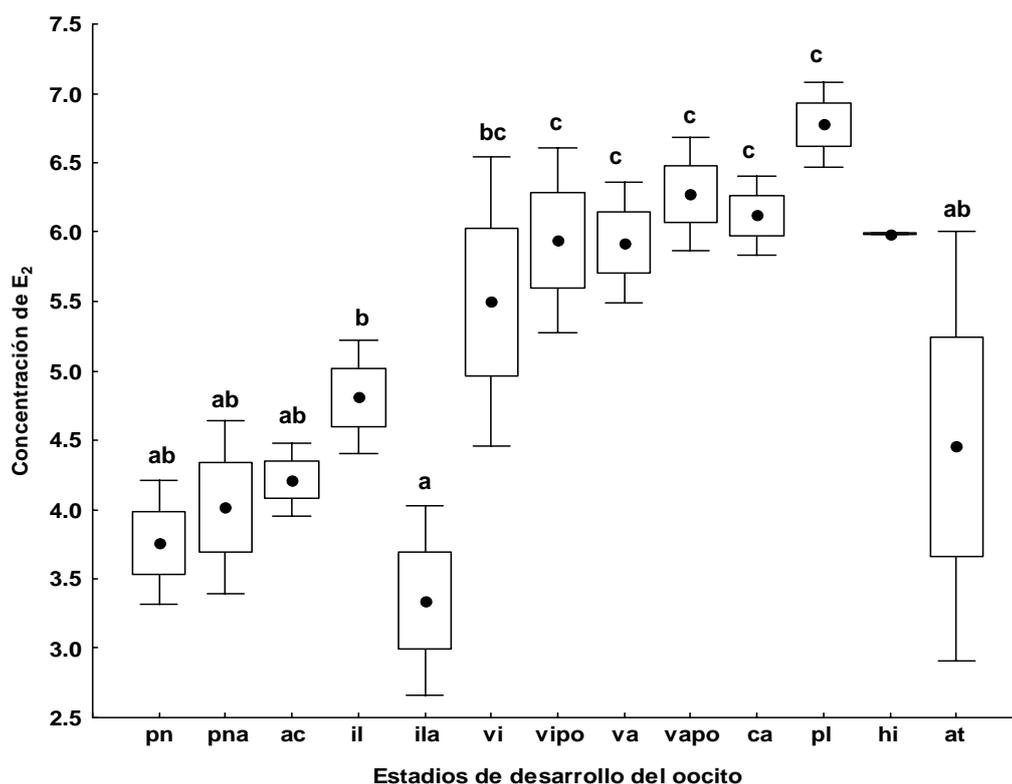


Figura 30. Valores promedio de estradiol en suero sanguíneo asociado a los diferentes estadios de desarrollo del oocito. Los valores de la concentración se presentan transformados a logaritmo natural. Se presenta el valor promedio, el error y la desviación estándar.

#### 4.1.2 VARIACIONES DE LOS NIVELES DE ESTRADIOL ASOCIADOS AL CICLO CIRCADIANO

La agrupación de los diferentes estadios de desarrollo del oocito por el horario de captura también mostró una variación con respecto a los niveles de estradiol (figura 31). Al dividir el ciclo de 24 horas en periodos de 6 horas cada uno se encontró que de las 0 a las 6 horas los niveles de estradiol fueron bajos en los estadios tempranos de desarrollo del oocito ( $< 300 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), e incrementaron en los estadios de vitelogenesis inicial y avanzada. El valor máximo se observó en el estadio proteólisis, con un posterior decremento en el estadio de

núcleo migratorio. Durante esta fracción del día los niveles de E<sub>2</sub> en estadios de desarrollo avanzado se mantuvieron entre los 400 y 600 pg·mL<sup>-1</sup>.

De las 6 a las 12 horas, los niveles de estradiol incrementaron durante la vitelogénesis, por arriba de 700 pg·mL<sup>-1</sup>, decrecieron en el estadio de células granulosas columnares y alcanzaron un valor máximo en el estadio de proteólisis (< 1500 pg·mL<sup>-1</sup>), decreciendo en el estadio de hidratación (40 pg·mL<sup>-1</sup>). Entre las 12 y 18 se presentó el mismo patrón que en el horario anterior pero con niveles de E<sub>2</sub> bajos: de los estadios de vitelogénesis inicial a células granulosas columnares se encontraron entre 300 y 400 pg·mL<sup>-1</sup>, con un máximo en el estadio de células granulosas columnares (1700 pg·mL<sup>-1</sup>).

De las 18 a las 24 horas los niveles de E<sub>2</sub> se mantuvieron por debajo de los 100 pg·mL<sup>-1</sup> hasta el estadio de vitelogénesis inicial. Durante la vitelogénesis avanzada incrementó y alcanzó el máximo en el estadio de células granulosas columnares (> 1400 pg·mL<sup>-1</sup>) para decrecer en el estadio de proteólisis (< 700 pg·mL<sup>-1</sup>). Las hembras con atresia presentaron valores por debajo de los 400 pg·mL<sup>-1</sup> en los diferentes horarios.

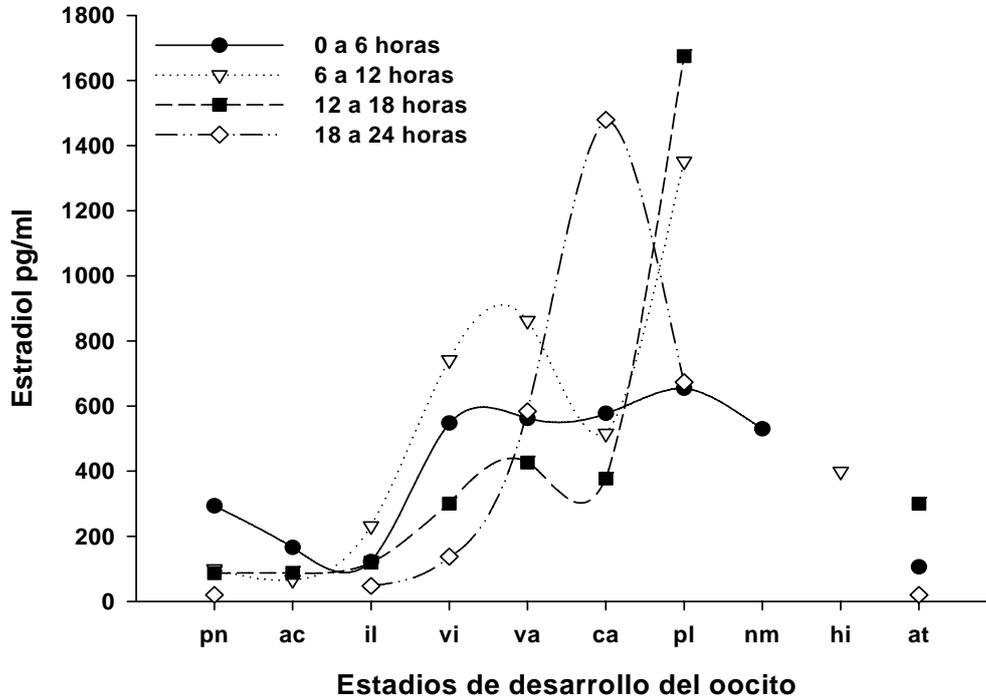


Figura 31. Variaciones en la concentración de estradiol asociado a los diferentes estadios de desarrollo del oocito y a la hora de captura de los ejemplares.

## 4.2. NIVELES DE CALCIO EN SUERO SANGUÍNEO.

En la figura 32 se observan las variaciones en las concentraciones de calcio en suero sanguíneo durante el periodo de muestreo. Se encontraron diferencias entre los diferentes meses de muestreo de cada temporada reproductiva (Tabla 13). En enero y febrero de 2003 no hubo diferencia significativa entre los valores promedio de la concentración de calcio que fueron de 15.35 y 13.61 mg·dL<sup>-1</sup> para los meses mencionados. Sin embargo, en abril se dio un incremento del valor promedio (18.74 mg·dL<sup>-1</sup>) que si presentó diferencia significativa con febrero.

En la temporada reproductiva de 2004, entre febrero y marzo no se presentaron diferencias significativas, los valores promedio fueron de 20.45 y 17.10 mg·dL<sup>-1</sup> para cada mes. En diciembre, el valor fue de 15.06 mg·dL<sup>-1</sup>, que presentó diferencia significativa respecto a los meses anteriores. En enero el promedio fue de 16.11 mg·dL<sup>-1</sup> y en marzo de 13.08 mg·dL<sup>-1</sup>, sin marcarse diferencia significativa entre ellos. En febrero de 2006 el promedio fue de 20.82 mg·dL<sup>-1</sup>, se presentó una variación más amplia que para cualquier otro muestreo.

Al hacer la comparación entre los mismos meses pero de diferentes temporadas reproductivas, también se observaron diferencias significativas en las concentraciones de calcio en suero sanguíneo. Febrero de 2003 presentó diferencia significativa respecto a los valores promedio de febrero de 2004 y 2006, mientras que entre estos dos últimos no se observaron diferencias significativas. En febrero de 2003 el valor promedio de las concentraciones fue bajo que en comparación a las siguientes temporadas reproductivas, presentándose los valores más altos en febrero de 2006. Marzo de 2004 también presentó diferencias significativas respecto a marzo de 2006, al observarse concentraciones de calcio más altas en 2004 que en 2006.

Tabla 13. Resumen del análisis de varianza de los niveles de Ca<sup>2+</sup> durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.

<b>N</b>	<b>Promedio</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Desv estandar</b>
156	17.06603	9.400000	40.00000	3.951700
<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
2.864410	8	0.358051	15.14873	0.000000

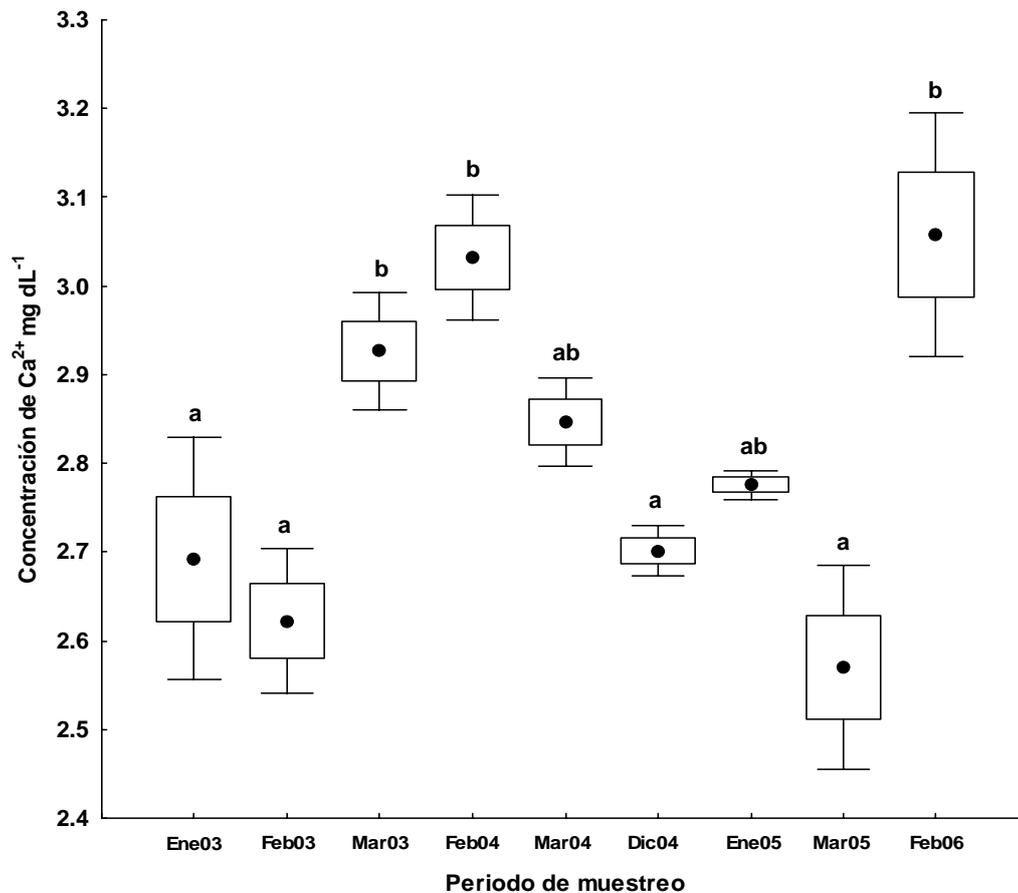


Figura 32. Valores promedio en las concentraciones de calcio en suero sanguíneo durante las diferentes temporadas reproductivas. Los valores se presentan transformados a logaritmo natural. Se presenta el valor promedio, el error y la desviación estándar.

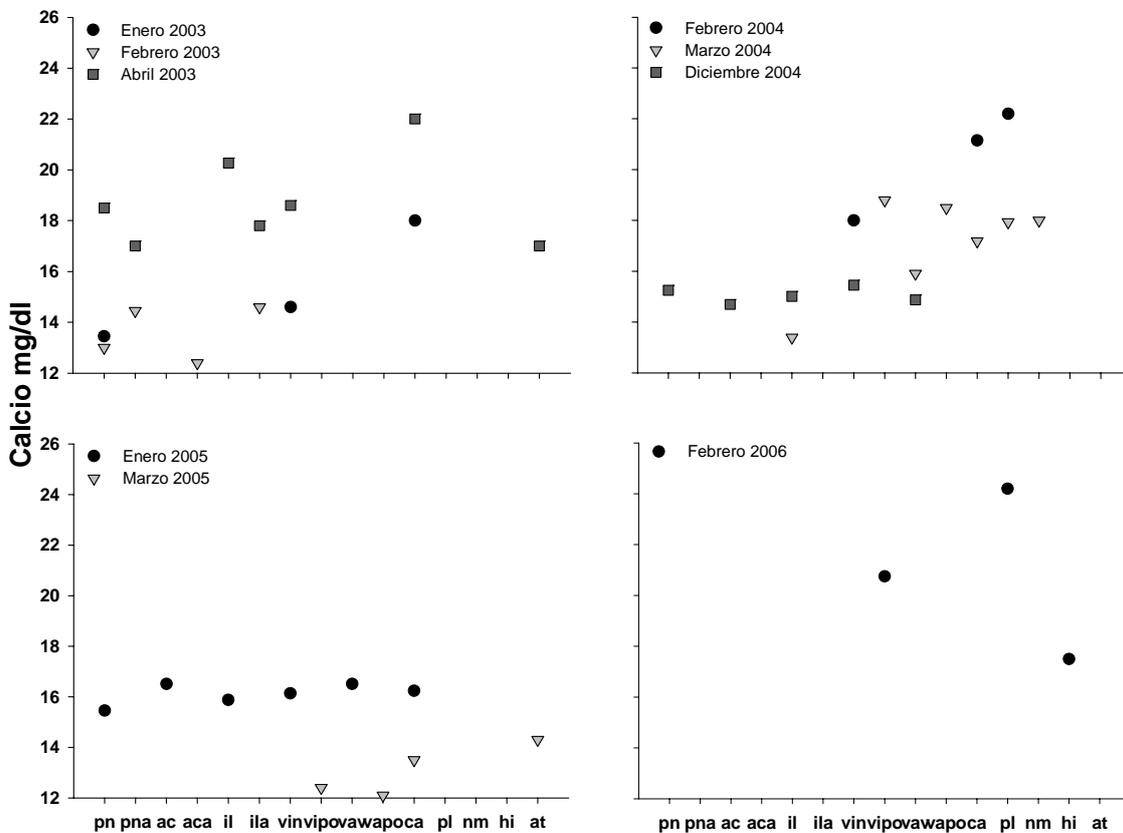
#### 4.2.1 NIVELES DE CALCIO ASOCIADOS A LOS ESTADIOS DE DESARROLLO DE LOS OOCITOS.

Al realizar el análisis de la concentración de calcio asociada al estadio de desarrollo más avanzado del oocito se observaron patrones diferentes en cada temporada reproductiva (figura 33). Para la temporada del 2003, en enero se observó la tendencia del incremento en los niveles de calcio, con un valor de  $13.45 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$  en el estadio perinúcleolar hasta  $18 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$  en el estadio de células columnares granulosas. En febrero el valor mínimo se encontró en el estadio de alvéolos corticales con atresias ( $12.40 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ ) y el máximo ( $14.60 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ ) en el estadio de inclusiones lipídicas también con presencia de atresias. En abril los valores de calcio en suero sanguíneo fueron más altos para los mismos estadios de desarrollo del oocito que en los meses anteriores. En el caso de los ejemplares que presentaron atresia masiva el calcio presentó un valor similar a los que presentaron estadios perinúcleolares e inclusiones lipídicas con atresias.

En febrero de 2004 las concentraciones de calcio se registraron a partir del estadio de vitelogénesis inicial con un valor de  $18 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$  y llegando a un máximo en el estadio de proteólisis con  $22.20 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ . Para marzo también se observó un incremento en los niveles de calcio, el valor mínimo se presentó en el estadio de inclusiones lipídicas con  $13.40 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ , mientras que en el estadio de núcleo migratorio fue de  $18 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ . Una particularidad notable fue que los valores más altos se presentaron en ejemplares con estadios de vitelogénesis inicial ( $18.80 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ ) y vitelogénesis avanzada con FPO ( $18.50 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ ), teniendo como comparación a las hembras en estadio de vitelogénesis avanzada con un valor por debajo de los  $16 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ . Diciembre de 2004 presentó poca variación, las concentraciones de calcio se encontraron entre los  $14.7$  y  $15.45 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ . Al parecer no hubo una relación entre el nivel de calcio y el estadio de desarrollo del oocito: los niveles altos se encontraron en los estadios de oocitos perinúcleolares y vitelogénesis inicial, mientras que los niveles bajos se presentaron en los estadios de alvéolos corticales y vitelogénesis avanzada.

En enero del 2005 los valores se encontraron entre  $15.45$  y  $16.5 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ . En este caso se observaron ligeros incrementos en la concentración de calcio conforme ocurrió el desarrollo del oocito, decreciendo al pasar del estadio de alvéolos corticales ( $16.5 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ ) a inclusiones lipídicas ( $15.87 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ ), alcanzando el nivel máximo en el estadio de células columnares granulosa ( $16.5 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ ). En marzo los niveles de calcio fueron los más bajos que se registraron. Los estadios de vitelogénesis inicial y avanzada con presencia de FPO presentaron niveles de calcio de  $12.4$  y  $12.1 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$  respectivamente, mientras que en el estadio de células granulosa columnares fue de  $13.5 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ . En este mes los ejemplares con atresia masiva fueron los que presentaron la mayor concentración de calcio al presentar valores de  $14.3 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ .

Para la temporada reproductiva de 2006 los niveles de calcio fueron los más altos que se registraron durante la temporada de estudio. Las hembras recolectadas presentaron niveles que se incrementaron con el estadio de desarrollo del oocito: en el estadio de vitelogénesis inicial con presencia de FPO, la concentración fue de  $20.75 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ . Al pasar al estadio de proteólisis la concentración se incrementó hasta alcanzar  $24.2 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$  para después decrecer al llegar al estadio de hidratación a  $17.5 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ .



### Estadios de desarrollo del oocito

Figura 33. Variaciones en las concentraciones de calcio por estadios de desarrollo del oocito en las diferentes temporadas reproductivas.

Al asociar los niveles de calcio en suero sanguíneo con los diferentes estadios de desarrollo y de manera independiente de la temporada, se encontró un patrón que difirió del encontrado para los niveles de estradiol en suero sanguíneo (figura 34). En este caso la concentración promedio de calcio fue más alta en el estadio de oocitos perinúcleolares ( $16.25 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ ) y decreció en el estadio de alvéolos corticales ( $14.86 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ ), incluyéndose en este decremento a los estadios de oocitos perinúcleolares y de alvéolos corticales que presentaron atresias. Al pasar al estadio de inclusiones lipídicas los niveles se incrementaron a  $15.85 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ .

En los estadios de vitelogénesis la concentración promedio de calcio fue más alta en las hembras que presentaron FPO que en aquellas que no presentaron indicios de desoves: en vitelogénesis inicial el valor fue de  $16.56 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$  y en las que presentaron PO fue de  $17.88$

mg-dL<sup>-1</sup>; en vitelogénesis avanzada fue de 15.71 mg-dL<sup>-1</sup> y con PO fue de 18.53 mg-dL<sup>-1</sup>. En el estadio de células columnares granulosas el nivel de calcio se encontró en 17.23 mg-dL<sup>-1</sup>. La concentración más alta se observó en el estadio de proteólisis con 21.72 mg-dL<sup>-1</sup> que fue el estadio que presentó diferencias significativas con otros estadios de desarrollo del oocito (Tabla 14). Los valores de calcio descendieron en los estadios de núcleo migratorio (18 mg-dL<sup>-1</sup>) e hidratación (17.5 mg-dL<sup>-1</sup>). En las hembras que presentaron atresia folicular masiva los niveles de calcio en suero sanguíneo fueron de 15.2 mg-dL<sup>-1</sup>.

Tabla 14. Resumen del análisis de varianza de los niveles de Ca<sup>2+</sup> asociado a los diferentes estadios de desarrollo de los oocitos.

<b>N</b>	<b>Promedio</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Desv estandar</b>
154	17.09026	9.400000	40.00000	3.958721
<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
1.332634	12	0.111053	3.187958	0.000466

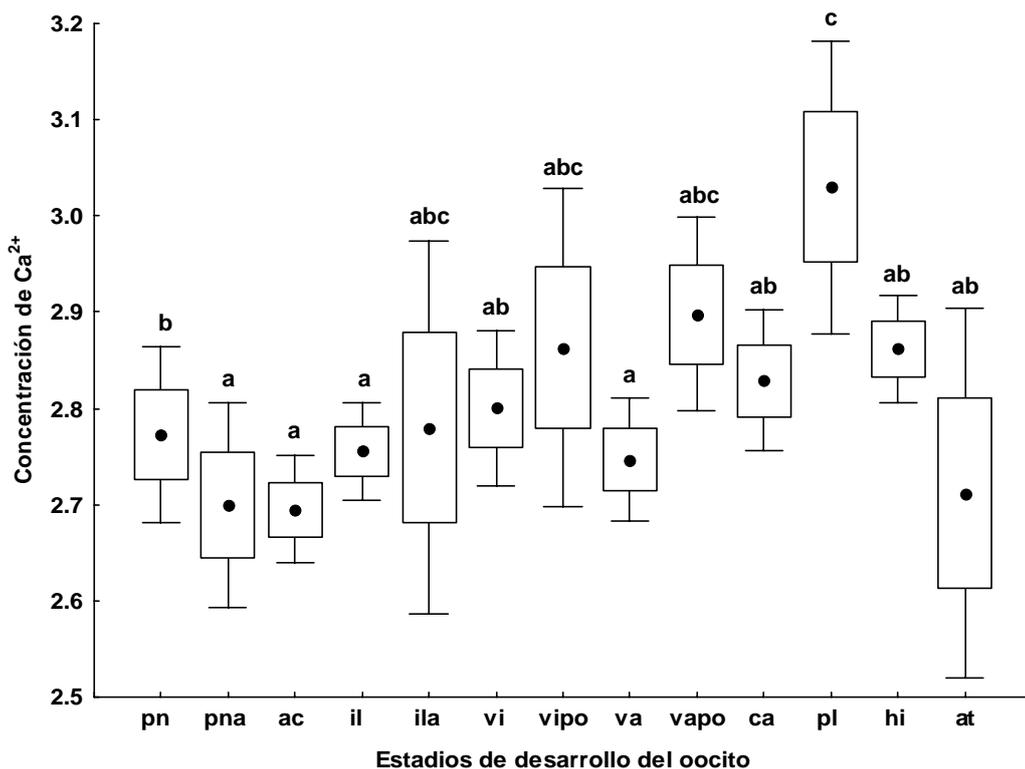


Figura 34. Valores promedio de calcio en suero sanguíneo asociado a los diferentes estadios de desarrollo del oocito. Los valores de la concentración se presentan transformados a logaritmo natural. Se presenta el valor promedio, el error y la desviación estándar.

#### **4.2.2 VARIACIONES DE LOS NIVELES DE CALCIO ASOCIADOS AL CICLO CIRCADIANO**

Al agrupar los estadios de desarrollo del oocito por horario de captura se observaron algunas variaciones respecto a las concentraciones de calcio (figura 35). Entre las 0 y 6 horas el valor más bajo de calcio se encontró en el estadio de alvéolos corticales ( $12.4 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ ) y alcanzó el valor más alto en hembras en vitelogénesis ( $18.8 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ ) y manteniéndose entre  $16.52$  y  $18 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$  en los demás estadios de desarrollo. De las 6 a 12 horas se observó un ligero incremento en los niveles de calcio. Desde el estadio de oocitos perinúcleolares hasta el de células granulosas columnares los niveles se incrementaron de  $15.8$  a  $16.23 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ , dándose un incremento notable en el nivel de calcio en el estadio de proteólisis hasta los  $22.25 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ . En la hidratación, que fue el estadio de desarrollo más avanzado, el calcio descendió a  $17.5 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ .

La concentración de calcio en suero sanguíneo fue baja entre las 12 y 18 horas del día, los valores se mantuvieron entre los  $13.63$  y  $14.55 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ , el valor bajo se observó en el estadio de inclusiones lipídicas y el valor alto en el estadio de células granulosas columnares. En este horario el estadio de desarrollo más avanzado que se observó fue el de proteólisis, en el cual se encontró el valor más alto de calcio en suero sanguíneo con un valor de  $36 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ . En el último cuarto del día, de las 18 a 24 horas, se encontraron los niveles de calcio más altos. Los niveles de calcio fueron similares para los estadios de oocitos perinúcleolares e inclusiones lipídicas ( $18.6 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ ), decrecieron en el estadio de vitelogénesis inicial ( $16.26 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ ) y alcanzaron el valor más alto en el estadio de proteólisis ( $21.9 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ ). En el caso de los ejemplares con atresia masiva la concentración de calcio también presentó variaciones. El valor bajo se observó entre las 0 y 6 horas y el más alto entre las 18 y 24 horas.

Aunque se presentaron variaciones en los niveles de calcio en los diferentes horarios, la tendencia general que se observó fue hacia un incremento conforme se dio el desarrollo del oocito. La variación fue más amplia entre las 0 y 6 horas que corresponde a las horas posteriores al máximo de desove. Entre las 6 y las 18 horas la variación disminuyó, registrándose los valores más altos después de las 12 horas. Después de las 18 horas, previo al inicio del desove, los niveles de calcio descendieron a niveles más bajos que en el resto del día.

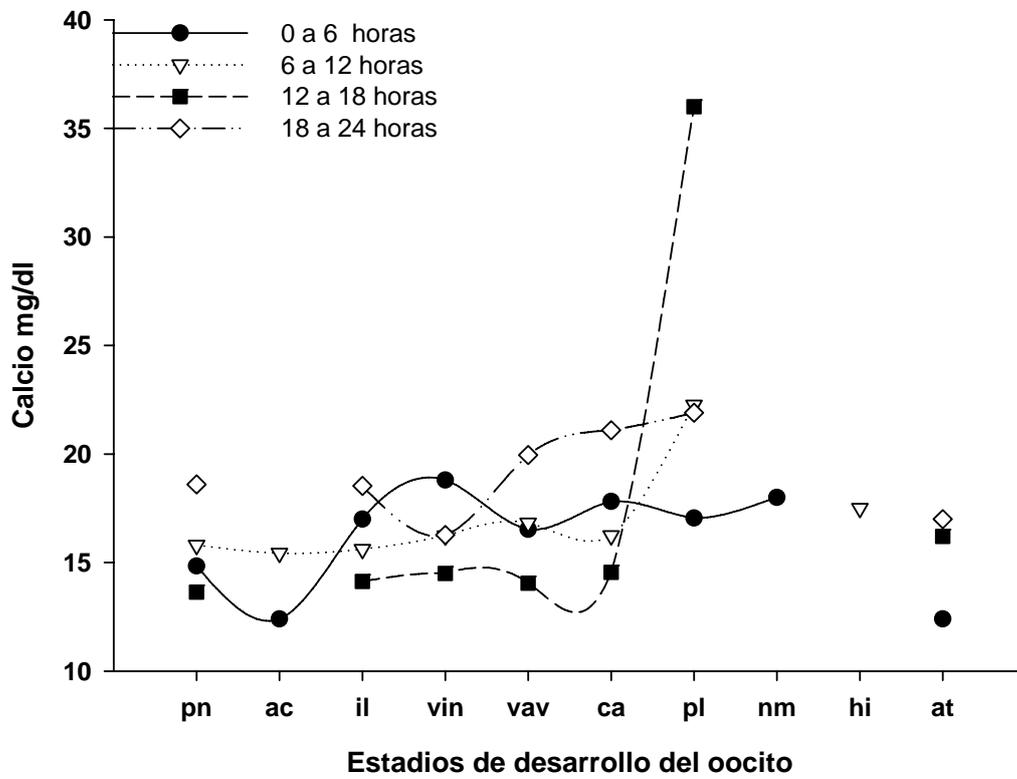


Figura 35. Variaciones en la concentración de estradiol en suero sanguíneo, asociado a los diferentes estadios de desarrollo del oocito y a la hora de captura de los ejemplares.

### 4.3. RELACIÓN DE LOS NIVELES DE ESTRADIOL Y CALCIO EN SUERO SANGUÍNEO.

La Tabla 15 resume los valores de estradiol y calcio encontrados en los diferentes estadios de desarrollo del oocito. Con base a los resultados obtenidos se busco determinar la relación estradiol-calcio. La prueba de correlación presentó un valor bajo al ser analizado el total de los datos (Figura 35). Se demostró que el 54.5% de los ejemplares se agruparon en el intervalo de 20 a 300 pg-dL<sup>-1</sup> de estradiol, con hembras en estadios desde perinúcleolares hasta proteólisis. A partir de los 300 pg-dL<sup>-1</sup> de estradiol la frecuencia de ejemplares disminuyó conforme incrementó la concentración de estradiol y los estadios de desarrollo del oocito que se presentaron fueron desde vitelogénesis inicial hasta la hidratación (figura 36).

Tabla 15. Concentraciones de estradiol y calcio en suero sanguíneo por estadio de desarrollo del oocito.

Estadio de desarrollo del oocito	N	Concentración de E <sup>2</sup>	Concentración de Ca <sup>2+</sup>	Estadio de desarrollo anterior
Perinúcleolares	15	60.23	16.25	
Perinúcleolares con atresias.	5	66.8	14.96	
Alvéolos corticales	11	74.04	14.86	
Alvéolos corticales con atresias	5	166	12.4	
Inclusiones lipídicas	24	146.84	15.85	
Inclusiones lipídicas con atresias	1	30	16.2	
Vitelogénesis inicial	8	474.18	16.57	
Vitelogénesis inicial con PO	6	531	17.89	
Vitelogénesis avanzada	15	481.93	15.71	
Vitelogénesis avanzada con PO	16	721.06	18.54	
Células granulosas columnares	27	600.71	17.24	Vitelogénesis inicial
Proteólisis	16	1028.06	21.73	Vitelogénesis inicial
Núcleo migratorio	1	530	18	Vitelogénesis inicial o avanzada
Hidratación	2	399	17.5	Vitelogénesis avanzada
Atresia masiva	3	136.5	15.2	

La frecuencia de hembras respecto al calcio alcanzo su máximo en el intervalo de 15 a 18 mg-dL<sup>-1</sup>, con el 46.8% de las hembras en estadios desde perinúcleolares hasta hidratación (figura 37). En concentraciones mayores de calcio los estadios de desarrollo del oocito que se presentaron fueron desde vitelogénesis inicial hasta proteólisis.

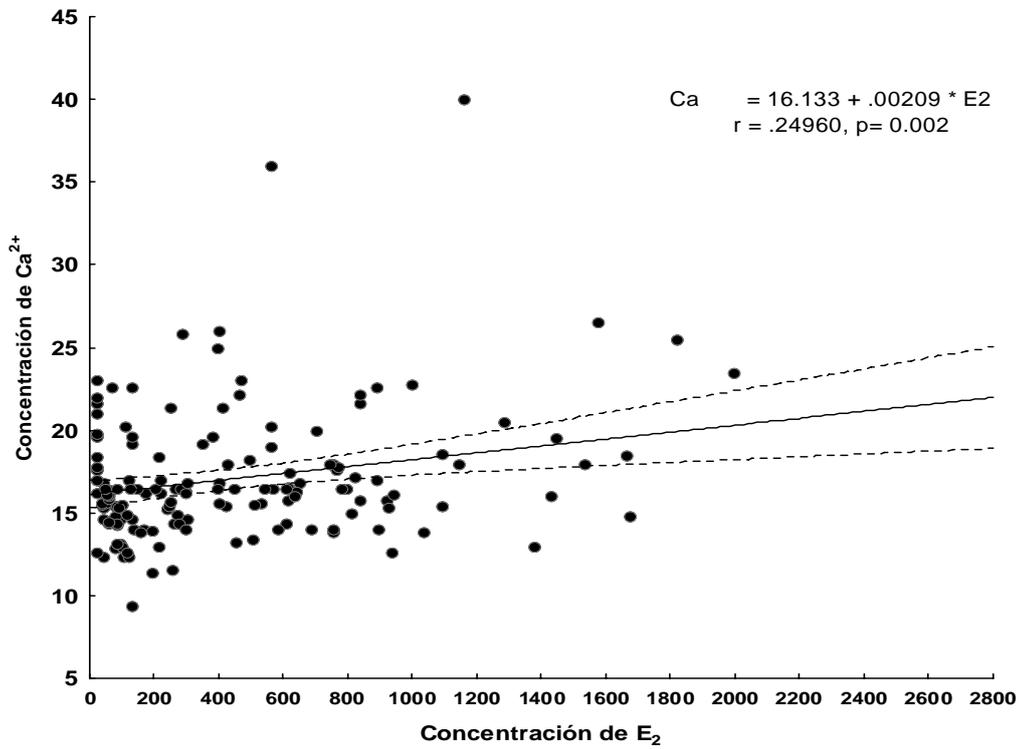


Figura 36. Gráfica de dispersión de la correlación entre los niveles de estradiol y calcio en suero sanguíneo.

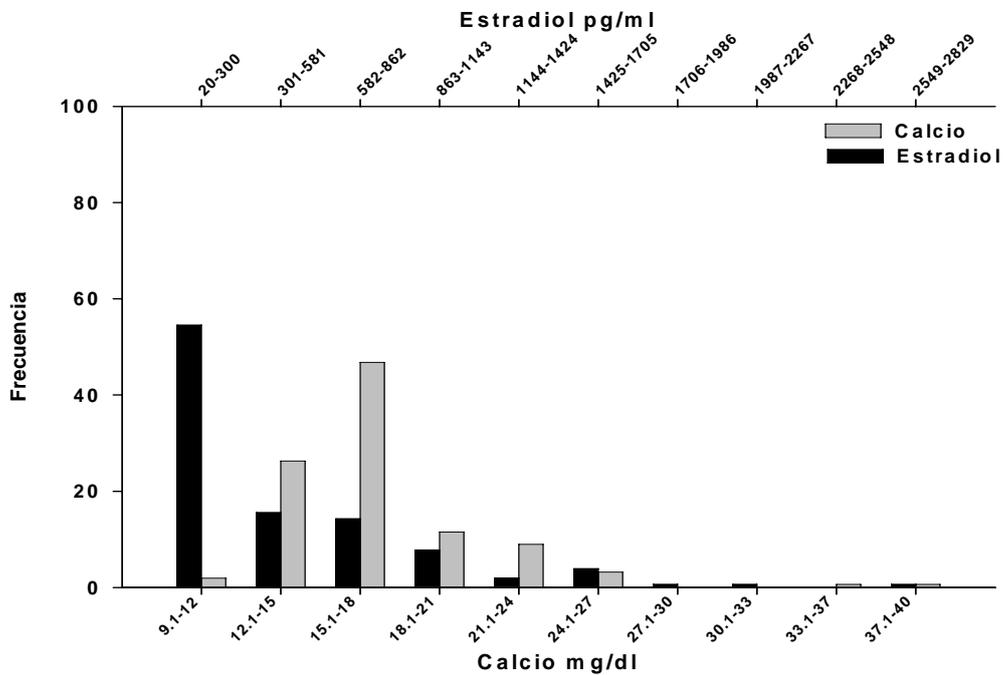


Figura 37. Distribución de frecuencia de hembras por concentraciones de estradiol y calcio en suero sanguíneo.

Aunque el valor de correlación fue bajo, el valor de p fue significativo (figura 36), por lo que se separaron los datos en grupos para definir que variables determinaba la correlación. El análisis demostró que el mes de captura presentó una correlación positiva en enero, febrero y abril, mas baja en marzo y en diciembre la correlación fue negativa (Figura 38, Tabla 16). En este caso los diagramas de dispersión mostraron los cambios que se presentaron en lo que se podría denominar temporada reproductiva promedio. Al inicio de la temporada reproductiva, diciembre, los valores promedio de estradiol fueron de 134 pg mL<sup>-1</sup> mientras que el calcio se encontró en un promedio de 14.9 mg mL<sup>-1</sup>. En enero el promedio de E<sub>2</sub> incrementó a 473 pg mL<sup>-1</sup> y el Ca<sup>2+</sup> a 16 mg mL<sup>-1</sup>. En febrero los valores presentaron una mayor dispersión, con un promedio del E<sub>2</sub> de 741 pg mL<sup>-1</sup> y el Ca<sup>2+</sup> de 19.7 mg mL<sup>-1</sup>. En marzo se observó una disminución de los valores promedio, el E<sub>2</sub> se encontró en 573.6 pg mL<sup>-1</sup> y el Ca<sup>2+</sup> en 16.7 mg mL<sup>-1</sup>; en abril los niveles decrecieron considerablemente llegando el E<sub>2</sub> a 30.7 pg mL<sup>-1</sup>, sin embargo el Ca<sup>2+</sup> se encontró en 18.8 mg mL<sup>-1</sup>.

Tabla 16. Parámetros de la correlación de E<sub>2</sub>-Ca<sup>2+</sup> agrupados por mes de muestreo de las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.

	<b>N</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
<b>DICIEMBRE</b>	31	15.0119	-0.0005	-0.0597	0.7496
<b>ENERO</b>	23	15.529	0.0011	0.3809	0.0729
<b>FEBRERO</b>	31	16.5959	0.0043	0.4089	0.0224
<b>MARZO</b>	53	16.4147	0.0006	0.0849	0.5454
<b>ABRIL</b>	16	17.7181	0.0362	0.3939	0.1312

La agrupación de los datos por fracción del día también mostró variaciones en la relación E<sub>2</sub>-Ca<sup>2+</sup> a lo largo del ciclo circadiano. Se observó que durante el día la correlación fue positiva, siendo esta significativa entre las 6 y las 12 horas, con concentraciones promedio de E<sub>2</sub> de 496.5 pg mL<sup>-1</sup> y Ca<sup>2+</sup> de 17.2 mg mL<sup>-1</sup>. Entre las 12 y 18 horas se mantuvo positiva, la concentración de E<sub>2</sub> fue de 476.5 pg mL<sup>-1</sup> y Ca<sup>2+</sup> de 14.4 mg mL<sup>-1</sup>. De las 18 a 24 horas, durante las horas del desove, la correlación fue baja, los niveles promedio de E<sub>2</sub> bajaron a 220 pg mL<sup>-1</sup> y el Ca<sup>2+</sup> de 14.2 mg mL<sup>-1</sup>. En las horas posteriores al desove, de las 0 a las 6 horas, la correlación fue baja y negativa, con valores de E<sub>2</sub> de 390.8 pg mL<sup>-1</sup> y Ca<sup>2+</sup> de 19.5 mg mL<sup>-1</sup>. Aunque en tres fracciones del ciclo el valor de p no fue significativo (Tabla 17), nuevamente se observó que existe variación y correlación en los niveles de E<sub>2</sub> y Ca<sup>2+</sup> en suero sanguíneo (Figura 40).

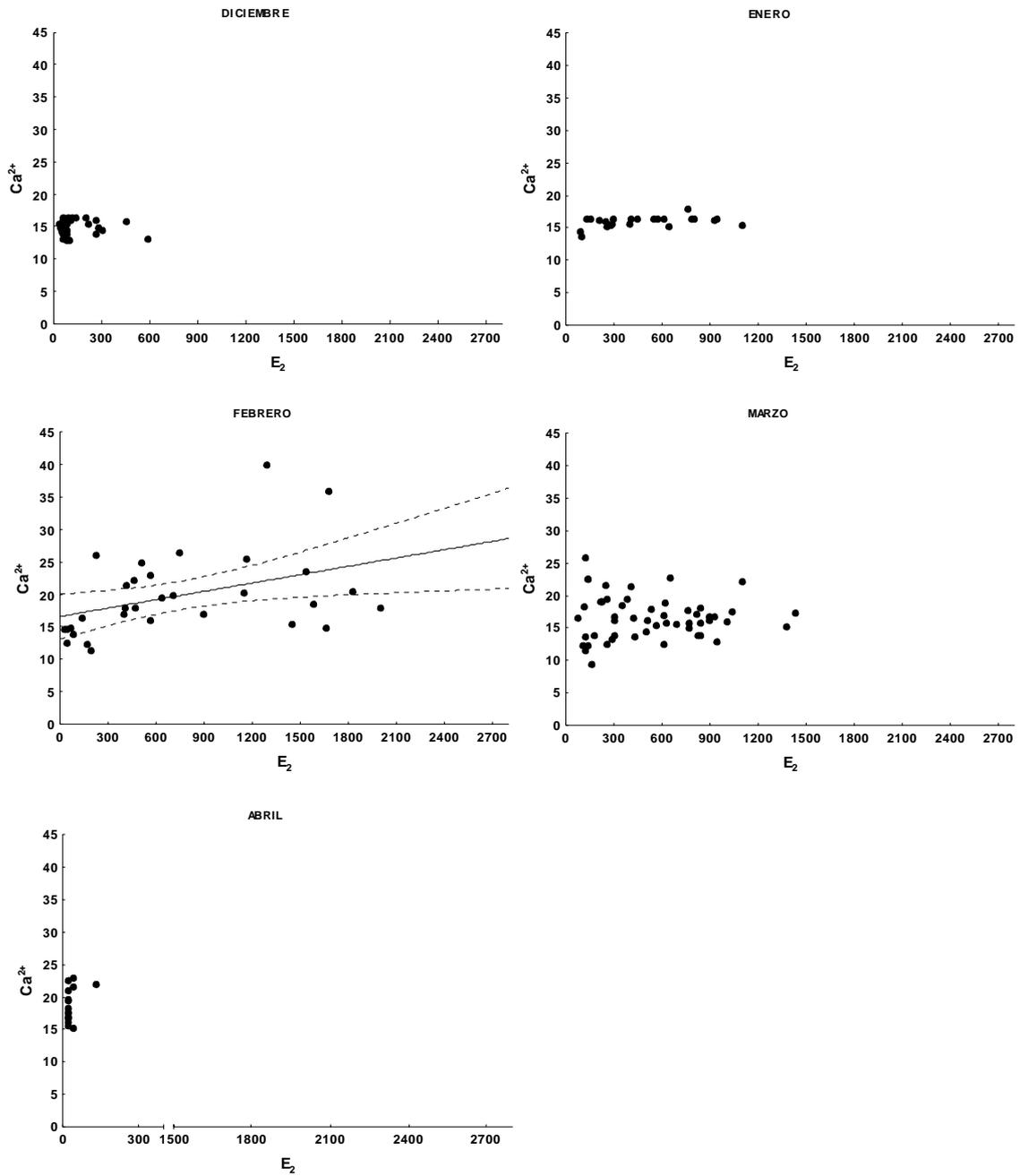


Figura 38. Gráfica de dispersión de la correlación entre los niveles de estradiol y calcio, agrupados por mes de muestreo.

La agrupación de los datos por intervalos de tallas mostró también una variación en la relación  $E_2$  y  $Ca^{2+}$  (Figura 40, Tabla 18) En los organismos con tallas entre los 120 y 140 mm de LP la correlación fue positiva. Las concentraciones promedio de  $E_2$  fueron de 351.2 pg mL<sup>-1</sup> y  $Ca^{2+}$  de 16.4 mg mL<sup>-1</sup>. De los 140 a 160 mm el valor de la correlación bajó,

manteniéndose positiva. Las concentraciones promedio incrementaron en  $E_2$  a  $401.3 \text{ pg mL}^{-1}$  y en  $Ca^{2+}$  a  $17 \text{ mg mL}^{-1}$ . En las hembras que se encontraron entre los 160 y 180 mm la correlación fue baja e inversa. Los niveles promedio incrementaron en  $E_2$  a  $652.7 \text{ pg mL}^{-1}$  y el  $Ca^{2+}$  a  $18.2 \text{ mg mL}^{-1}$ . En hembras con tallas superiores a los 180 mm la correlación aumento y se mantuvo inversa. Las concentraciones promedio de  $E_2$  fueron de  $671.5 \text{ pg mL}^{-1}$  y  $Ca^{2+}$  de  $17.5 \text{ mg mL}^{-1}$ . A excepción del intervalo de 160 a 180 mm de LP, el valor de p fue significativo

Tabla 17. Parámetros de la correlación de  $E_2$ - $Ca^{2+}$  agrupados por fracción de día en un ciclo de 24 horas.

	N	a	b	r	p
18 a 24	25	19.403	4.20E-03	0.07032	0.738
0 a 6	59	17.46	-5.00E-04	-0.0541	0.697
6 a 12	50	14.744	0.0036	0.4836	0.002
12 a 18	19	13.307	0.0043	0.43	0.0749

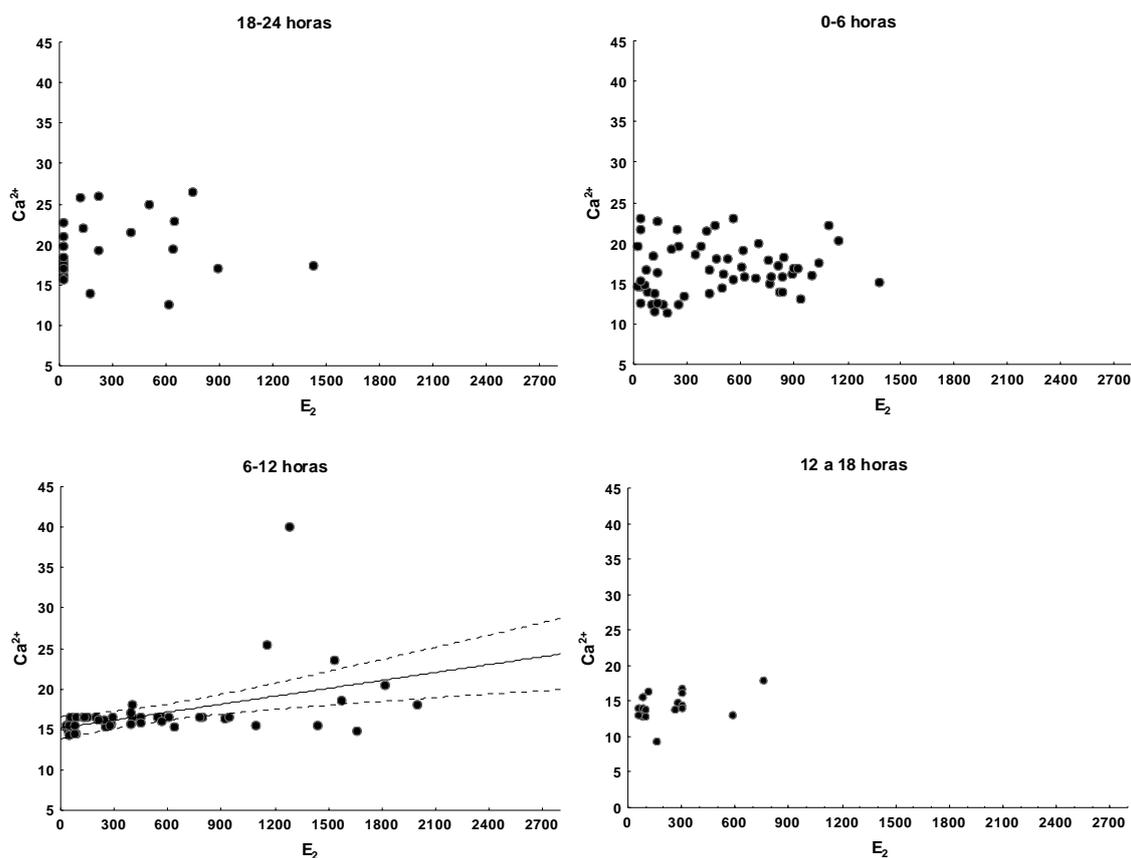


Figura 39. Gráfica de dispersión de la correlación entre los niveles de estradiol y calcio agrupados por fracción de día en un ciclo de 24 horas.

Tabla 18. Parámetros de la correlación de  $E_2$ - $Ca^{2+}$  agrupados por intervalos de tallas.

	N	a	b	r	p
120 a 140	41	13.7511	7.50E-03	0.6934	0.0000005
140 a 160	75	16.0827	0.0024	0.2868	0.0126
160 a 180	29	19.0908	-0.0013	-0.1946	0.3117
180 a 200	8	22.3145	-7.20E-03	-0.7873	0.0204

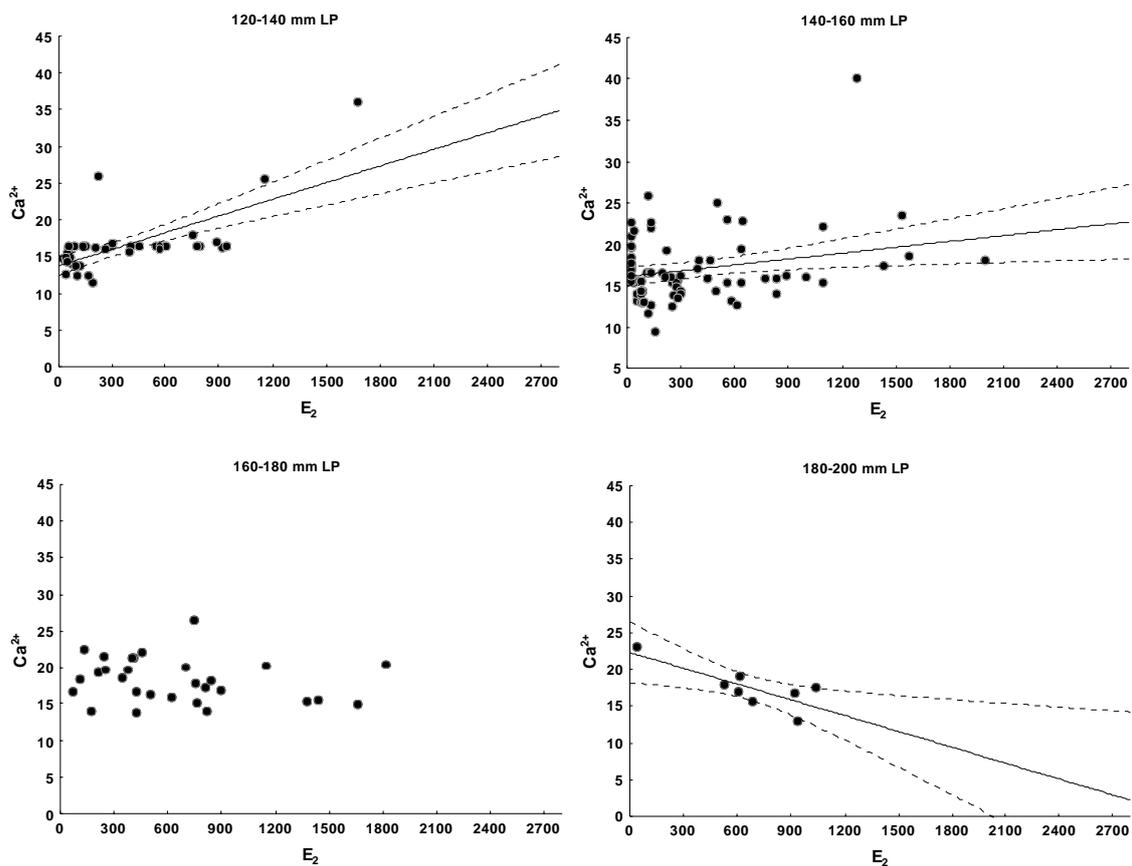


Figura 40. Gráfica de dispersión de la correlación entre los niveles de estradiol y calcio en suero sanguíneo.

## 5. PARAMETROS HEMATOLÓGICOS.

### 5.1 HEMATOCRITO

El hematocrito presentó variaciones a lo largo del periodo de muestreo, en el cual los valores promedio mensuales fueron desde 41.2 a 61.14% en la relación suero-paquete celular. Se encontraron diferencias significativas entre las diferentes temporadas reproductivas (figura 41, Tabla 19). Los valores promedio de hematocrito de la temporada 2003 presentaron diferencias significativas con febrero y marzo de 2004 y marzo de 2005. La temporada reproductiva de 2004 (febrero y marzo) presentó diferencias significativas con las otras temporadas reproductivas, presentando los valores de hematocrito más bajos, con un valor promedio de 41.2% en marzo. Para la temporada reproductiva del 2005 los valores de hematocrito se encontraron por arriba del 50%, presentándose el valor más alto en marzo (61.14%). Febrero del 2006 solo presentó diferencia significativa con la temporada del 2004.

Tabla 19. Resumen del análisis de varianza de los valores de hematocrito durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.

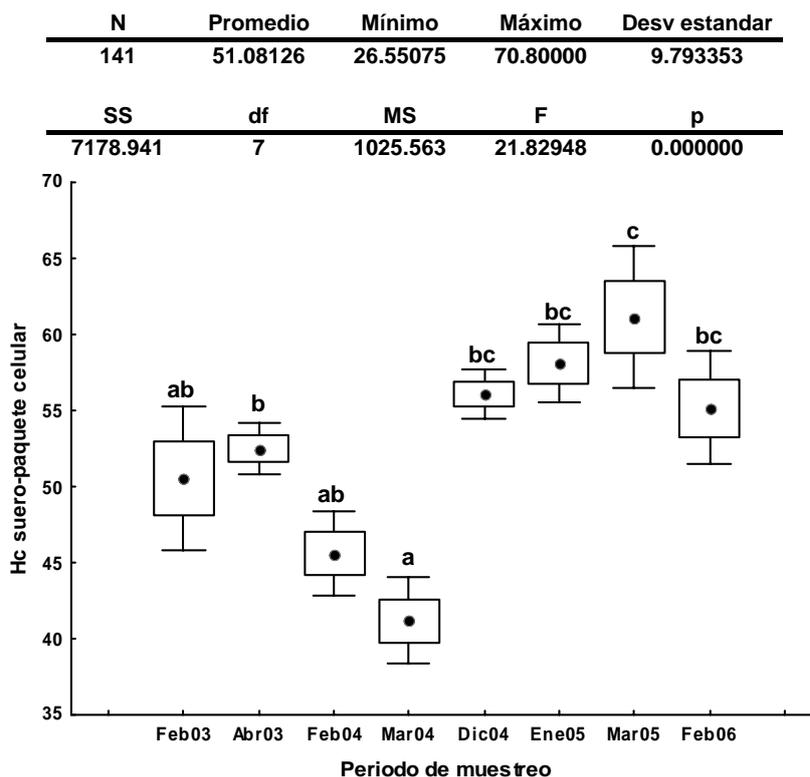


Figura 41. Variaciones del hematocrito de *S. sagax* durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006. Se presenta el valor promedio, el error y la desviación estándar.

En relación al ciclo circadiano, el hematocrito mostró diferencias significativas entre las diferentes fracciones del día (Tabla 20). Durante las horas de oscuridad el valor mínimo observado fue de 46.92%, lo cual ocurrió en las horas previas al desove. Después de este periodo el hematocrito incrementó alcanzando un valor promedio máximo de 57.15% entre las 12 y 18 horas (figura 42).

Tabla 20. Resumen del análisis de varianza de los valores de hematocrito asociados al ciclo circadiano.

<b>N</b>	<b>Promedio</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Desv estándar</b>
204	53.08	46.92	57.15	9.33
<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
2581.427	3	860.4756	11.40164	0.000001

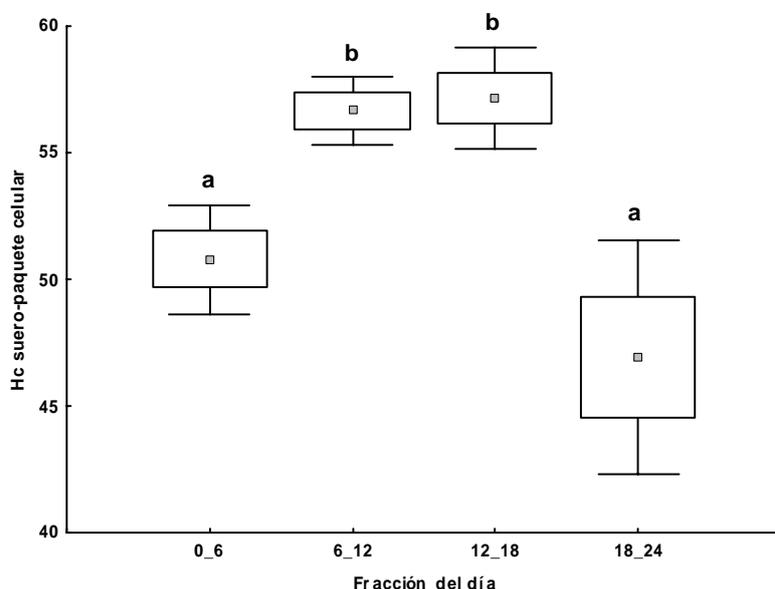


Figura 42. Variaciones del hematocrito de *S. sagax* por fracción de día. Se presenta el valor promedio, el error y la desviación estándar.

El hematocrito también se vio influenciado por la talla de los organismos. Se encontró una relación inversa significativa (Tabla 21). Las hembras de menor talla presentaron una mayor proporción de suero en la sangre, siendo más fuerte la correlación entre los 130 y 150 mm de LP. Conforme la talla fue incrementando esta proporción fue disminuyendo, encontrándose una mayor variación en la proporción de suero-paquete celular, principalmente en hembras con tallas superiores a los 160 mm de LP (figura 43).

Tabla 21. Parámetros de la correlación del hematocrito vs. longitud patrón en las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.

<b>N</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
204	117.923	-0.4297	-0.5274	0.0001

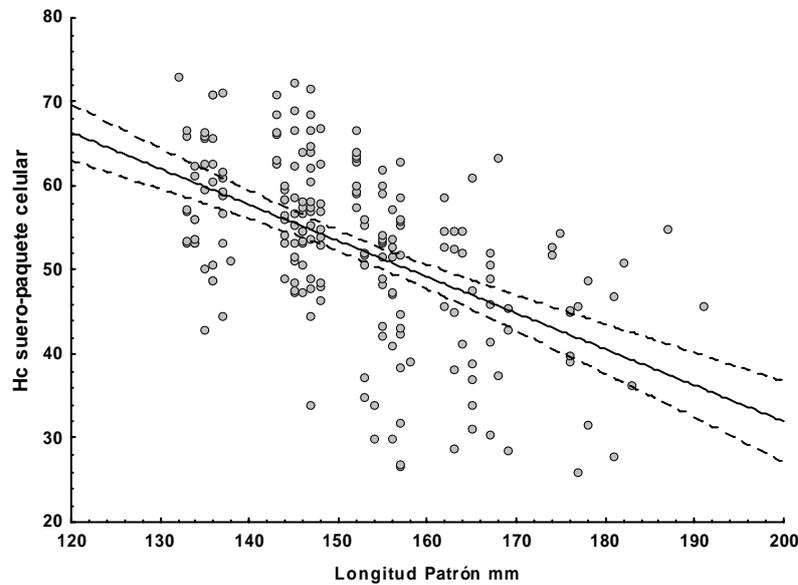


Figura 43. Diagrama de dispersión de los valores del hematocrito en relación a la longitud patrón de *S. sagax*.

## 5.2. HEMATOCRITO ASOCIADO A LOS ESTADIOS DE DESARROLLO DEL OOCITO

Al asociar el valor del hematocrito a los diferentes estadios de desarrollo se pudo observar el patrón de cada uno de los meses de muestreo en las diferentes temporadas reproductivas (figura 44). En la temporada del 2003 se encontraron valores de hematocrito que fueron desde 44.68 hasta 58.1% en la proporción suero-paquete celular. El hematocrito fue más alto en los primeros estadios de desarrollo, alcanzó el valor más alto en el estadio de vitelogénesis inicial (54.95%) y disminuyó en el estadio de células granulosas columnares (50%). En esta temporada las hembras que presentaron atresias fueron las que tuvieron un porcentaje más alto de hematocrito (58%).

En la temporada de 2004 el patrón en ambos meses presentó una tendencia similar: en los estadios de desarrollo más tempranos, de perinúcleares a inclusiones lipídicas, los valores de hematocrito se encontraron en una proporción por arriba del 50% de suero. En marzo de dicha temporada se pudo apreciar esta relación entre el hematocrito y los estadios de desarrollo. En el estadio de inclusiones lipídicas el hematocrito se encontró cerca del 50%; al entrar en el proceso de maduración del oocito los valores variaron. Las hembras que presentaron oocitos en vitelogénesis inicial con presencia de PO presentaron un hematocrito bajo (32.8%), lo cual también se observó en el estadio de proteólisis (38%). En el primero de los casos las hembras se encontraban en una fase posterior al desove y en el segundo caso las hembras estaban al inicio del proceso de acumulación de fluidos en el oocito. En el caso

de los estadios de vitelogénesis avanzada y de células granulosas columnares los valores fueron mas altos que en los estadios ya mencionados. El único ejemplar que se encontró en estadio de núcleo migratorio presento un valor de hematocrito más alto que el de los estadios anteriores, sin embargo este se encontró por debajo del 50% en la relación suero-paquete celular.

En 2005 se observaron valores altos del hematocrito que fueron desde 55.3 hasta 64% en la relación suero-paquete celular. La tendencia observada fue hacia el incremento conforme se desarrollaba el oocito, el valor más alto de hematocrito se presentó en las hembras con atresia folicular masiva (64%). En 2006 también se presentaron valores de hematocrito altos, se observó la tendencia en la disminución del hematocrito al pasar del estadio de proteólisis (57%) al de hidratación (53.9%).

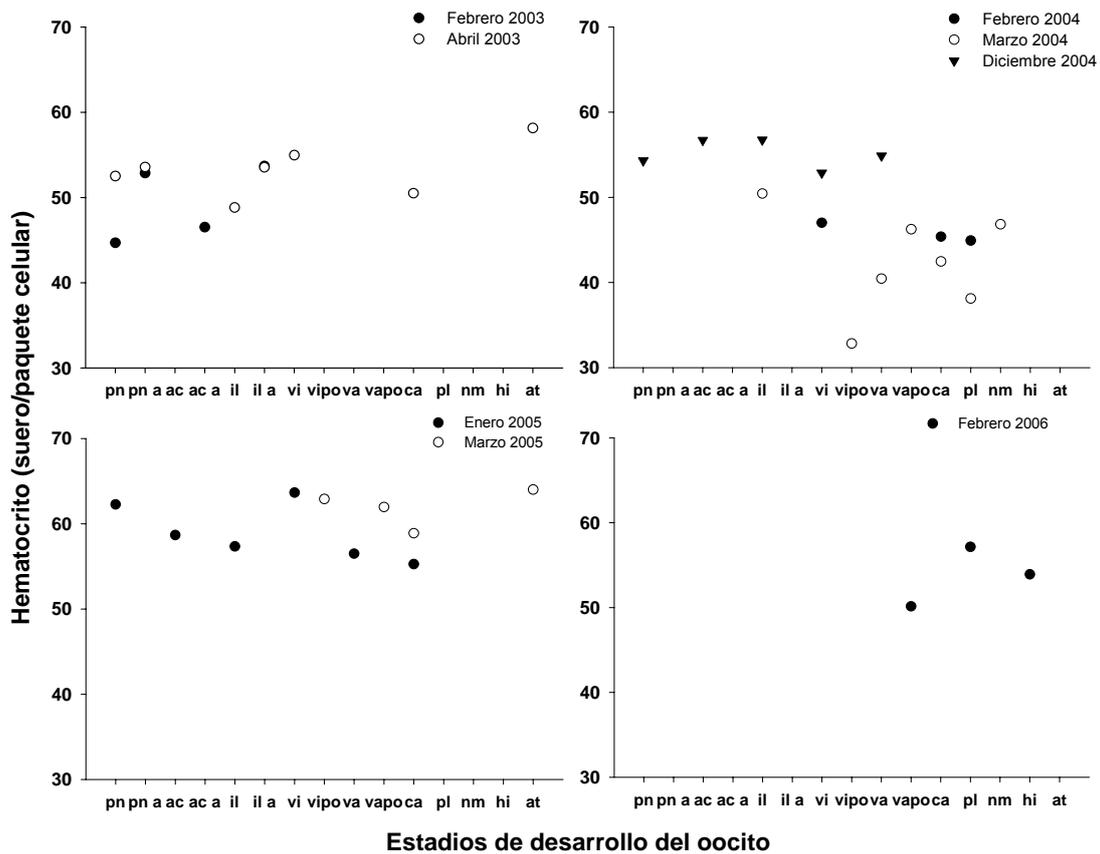


Figura 44. Variaciones del hematocrito asociado a los diferentes estadios de desarrollo del oocito para las diferentes temporadas reproductivas.

Al hacer una agrupación de los valores de hematocrito asociados a los diferentes estadios de desarrollo se observaron diferencias significativas (Tabla 22). Desde el estadio de oocitos

perinúcleolares hasta la vitelogénesis inicial los valores promedio de hematocrito se encontraron por arriba del 53% en la relación suero-paquete celular. En las hembras que presentaron vitelogénesis inicial con PO el valor promedio de hematocrito decreció hasta 37%. A partir del estadio de vitelogénesis avanzada hasta el estadio de núcleo migratorio la relación suero-paquete celular se mantuvo por debajo del 50% y esta incrementó hasta 53.9% en el estadio de hidratación. La atresia masiva se encontró asociada al valor más alto (62%) (Figura 45).

Tabla 22. Resumen del análisis de varianza de los valores de hematocrito asociado a los diferentes estadios de desarrollo de los oocitos.

N	Promedio	Mínimo	Máximo	Desv estandar
139	51.14468	26.55075	70.80000	9.849556
SS	df	MS	F	p
3440.633	12	286.7194	3.631816	0.000111

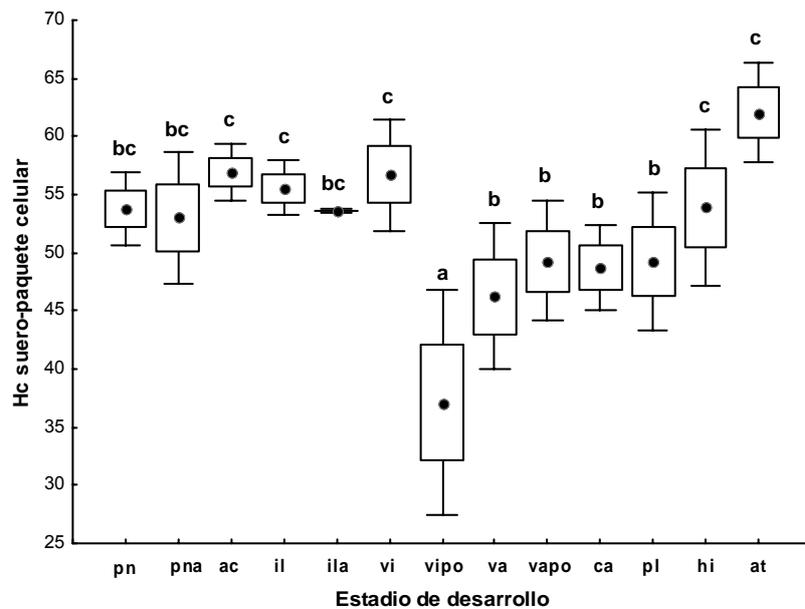


Figura 45. Valores promedio del hematocrito asociado a los diferentes estadios de desarrollo del oocito.

### 5.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS

#### 5.3.1 SERIE ROJA

Dentro del linaje de la serie roja se encontraron diferentes estados de madurez de las células. El primer tipo de células que se identificó fueron los eritroblastos basófilos, estos se encontraron escasamente en las extensiones sanguíneas y se caracterizaron por ser células de forma redondeada, con poco citoplasma el cual presentó una fuerte basofilia. El núcleo fue grande en proporción al tamaño de la célula (figura 46), ubicado en posición central y con

basófila ligeramente menor que el citoplasma, con cromatina fina y dispersa. La talla promedio de estas células fue de  $\mu\text{m}$ . Los eritroblastos policromatófilos presentaron una forma más redondeada con una talla promedio de  $8.11 \mu\text{m}$  ( $\pm 0.58 \mu\text{m}$ ), con citoplasma basófilo; el núcleo presentó una cromatina laxa, de aspecto granular. La relación núcleo-citoplasma disminuyó, manteniéndose el núcleo en posición central. Conforme las células se aproximaron más al estado maduro el citoplasma fue perdiendo la basofilia y adquiriendo la forma ovalada.

Los eritrocitos, que son la forma madura de las células de la serie roja, presentaron forma ovalada, el citoplasma adquirió afinidad acidófila, con una talla promedio en el eje mayor de  $\mu\text{m}$ . El núcleo se mantuvo en posición central, de forma ovalada con talla promedio de  $\mu\text{m}$ ; la cromatina se observó compacta y con una basofilia mas fuerte que en los estados inmaduros (figura 46). En algunos casos se detectaron núcleos que presentaron una constricción en la parte media, dándole una forma de 8.

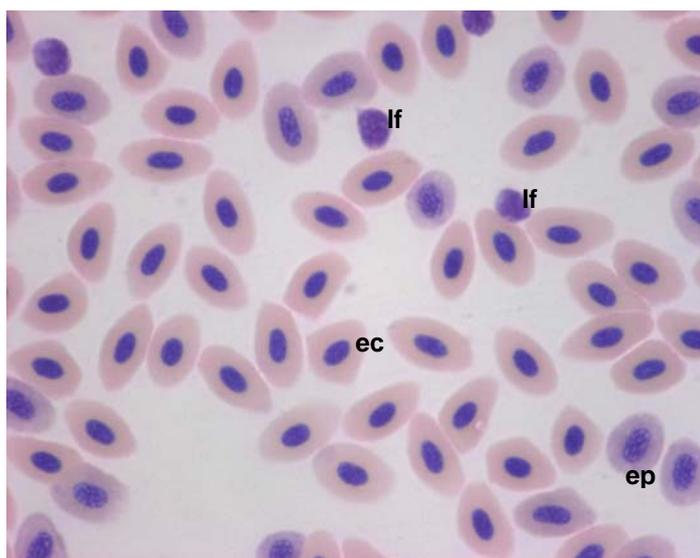


Figura 46. Micrografía de extensión sanguínea de *S. sagax*. Se observan los eritrocitos maduros (ec), eritrocitos policromatófilos (ep) y linfocitos (lf). Técnica de Romanowsky. Aumento a 1000X.

### 5.3.2 SERIE BLANCA

Dentro del linaje de células blancas o leucocitos se pudieron identificar dos principales grupos de células: los que presentaron material granular en el citoplasma, denominados granulocitos, los cuales se dividieron en neutrófilos, eosinófilos y basófilos y los que no presentaron material granular como los linfocitos, monocitos y trombocitos.

## Linfocitos

Los linfocitos son células esféricas, de afinidad basófila con escaso citoplasma que en algunos casos se observó como un halo de afinidad basófila muy débil en células jóvenes, mientras que en células maduras el citoplasma fue más escaso. En los linfocitos grandes el núcleo presentó cromatina laxa y en linfocitos pequeños esta fue más compacta (Figura 47).

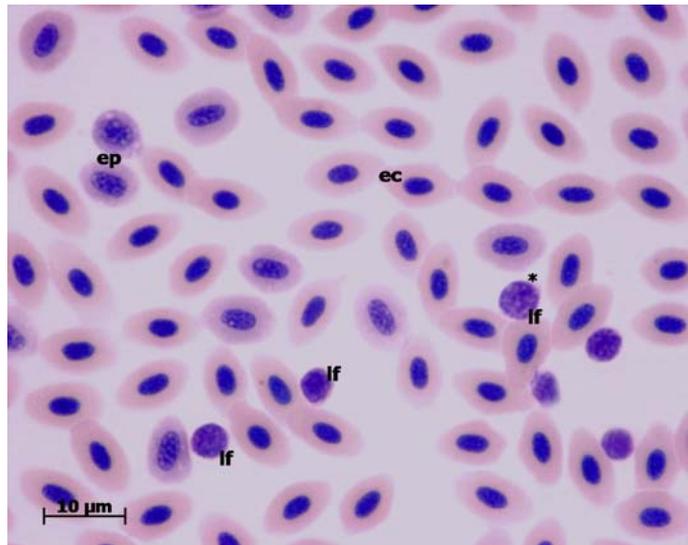


Figura 47. Micrografía de extensión sanguínea de *S. sagax*. Se observan linfocitos de diferentes tamaños (lf) y el halo de citoplasma (\*), eritrocitos (ec) y eritrocitos policromatófilos (ep). Técnica de Romanowsky. Aumento 1000X.

## Granulocitos

### Granulocitos neutrófilos

Los granulocitos neutrófilos presentaron citoplasma con escasa afinidad acidófila. En las extensiones sanguíneas se observaron diferentes estados de madurez de estas células. En células jóvenes se presentó un solo núcleo periférico, en forma semiesférica y en algunos casos en forma de riñón, con material nuclear laxo; el citoplasma presentó gránulos muy finos con escasa afinidad a los colorantes con la técnica de Romanowsky. Otras células presentaron un núcleo bilobulado o en banda, denominados así por la forma en que se encontraron unidos los lóbulos, los cuales fueron de igual o diferente tamaño. El estado más maduro los granulocitos neutrófilos se caracterizaron por la presencia de un núcleo polimorfo con varios lóbulos, por lo general de 3 a 4, de diferentes tamaños y unidos por bandas delgadas de material nuclear. No se observaron cambios en la coloración del citoplasma de estas células conforme el núcleo se segmentó (Figura 48).

### Granulocitos eosinófilos

La característica principal de este tipo de células fue la presencia de gránulos en el citoplasma con afinidad acidófila. Con la técnica de Romanowsky los gránulos presentaron una coloración rosa-anaranjado (Figura 49 A). El núcleo, de forma más o menos redonda, se observó en posición periférica y con material nuclear laxo. Se pudo observar en algunos casos granulocitos eosinófilos pequeños, con un citoplasma más reducido pero con una coloración más fuerte con tendencia al anaranjado (Figura 49 B).

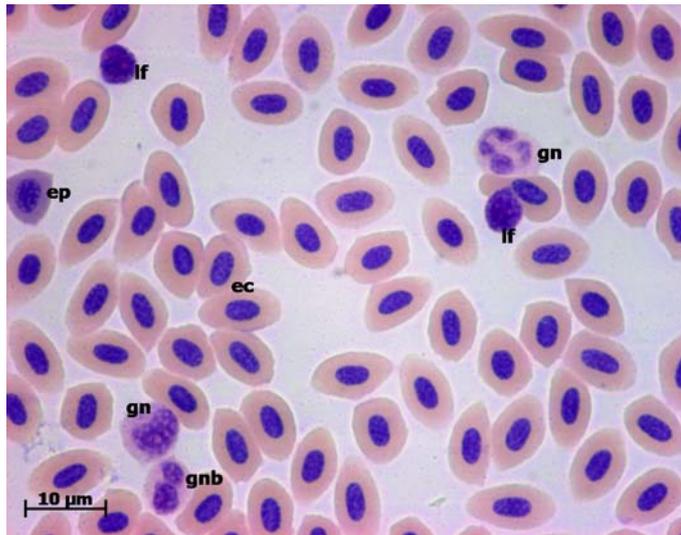


Figura 48. Micrografía de extensión sanguínea de *S. sagax*. Se observan diferentes etapas de madurez de granulocitos neutrófilos: granulocito con núcleo en forma de riñón (gn), granulocito neutrófilo bilobulado (gnb) y con núcleo polimorfo (gnp). Linfocitos (lf), eritrocitos (ec) y eritrocitos policromatófilos (ep). Técnica de Romanowsky. Aumento 1000X.

### Granulocitos basófilos.

Estas células también presentaron núcleo periférico de forma redondeada, con abundante citoplasma en el que se pudieron observar gránulos con fuerte afinidad basófila y más grandes que los de los granulocitos eosinófilos (Figura 50).

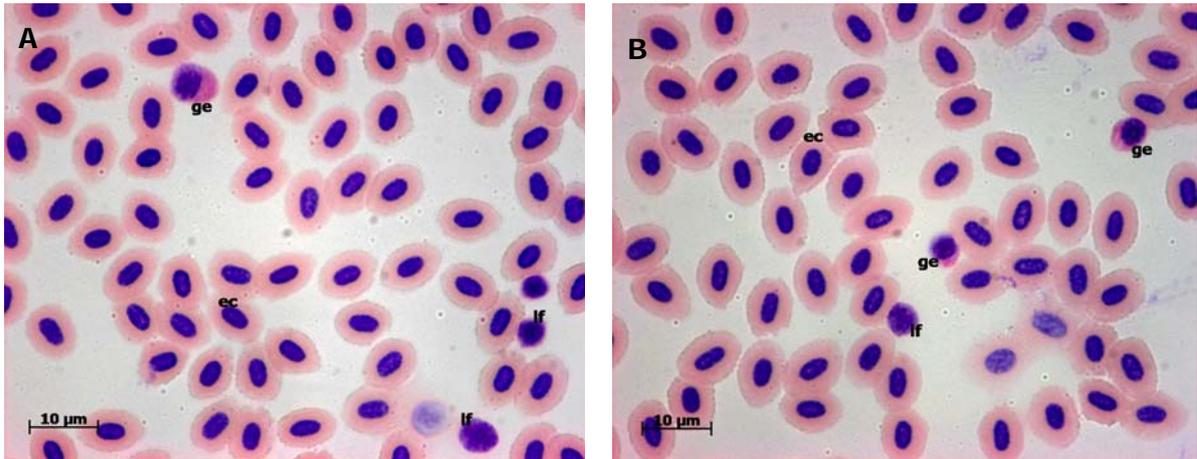


Figura 49. Micrografía de extensión sanguínea de *S. sagax*. Se observan granulocitos eosinófilo (ge) de diferentes tamaños. Linfocitos (lf), eritrocitos (ec). Técnica de Romanowsky. Aumento 1000X.

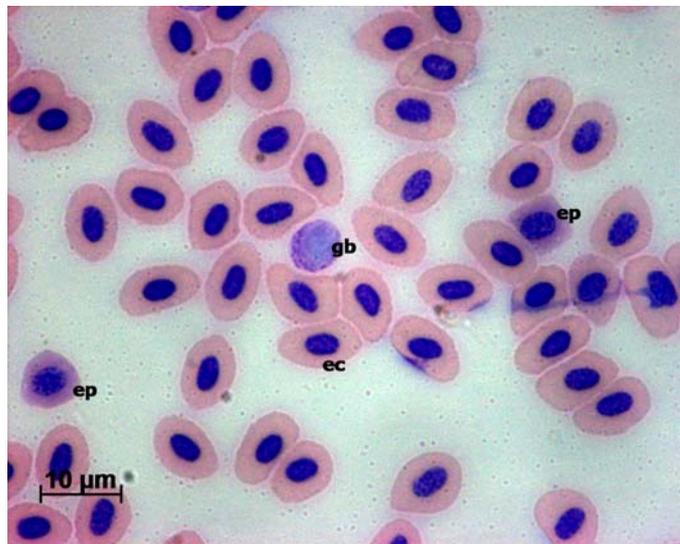


Figura 50. Micrografía de extensión sanguínea de *S. sagax*. Se observa un granulocito basófilo (gb), eritrocitos (ec) y eritrocitos policromatófilos (ep). Técnica de Romanowsky. Aumento 1000X.

### Monocitos

Estos fueron los leucocitos de mayor tamaño. Los monocitos presentaron citoplasma abundante de aspecto hialino que vario en la intensidad de la basofilia. El núcleo fue excéntrico, varía desde una forma redondeada (Figura 51 A) a aquellos que presentan forma de riñón (Figura 51 B), con cromatina que fue más laxa en monocitos maduros que en los inmaduros. En el citoplasma se pudieron observar vacuolas y la presencia de gránulos con afinidad basófila.

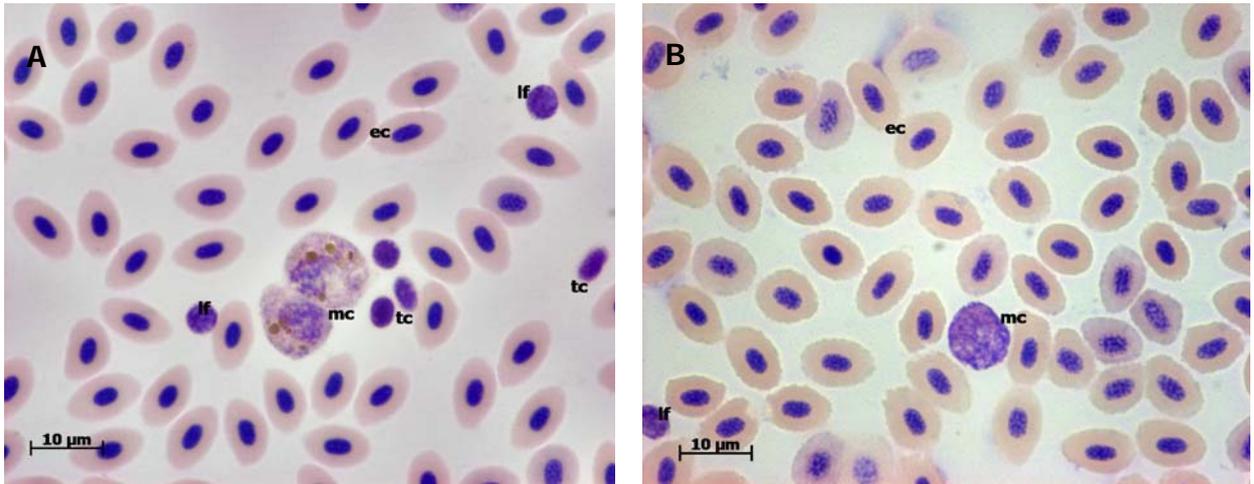


Figura 51. Micrografía de extensión sanguínea de *S. sagax*. A) Se observan monocitos (mc) con vacuolas. B) Monocito con núcleo en forma de riñón y cromatina más compacta (mc). Linfocitos (lf), eritrocitos (ec) trombocitos (tc). Técnica de Romanowsky. Aumento 1000X.

### Trombocitos

Los trombocitos presentaron tres formas: redondeados, ovalados de forma espiculada, estos últimos fueron los menos frecuentes. Los trombocitos de forma redonda fueron muy similares a los linfocitos maduros, sin embargo estos se pudieron distinguir de los linfocitos por no presentar prácticamente citoplasma. Otra característica de los trombocitos fueron las agregaciones que se observaron en las extensiones sanguíneas, en las cuales se pudieron observar las diferentes formas de trombocitos (Figura 52).

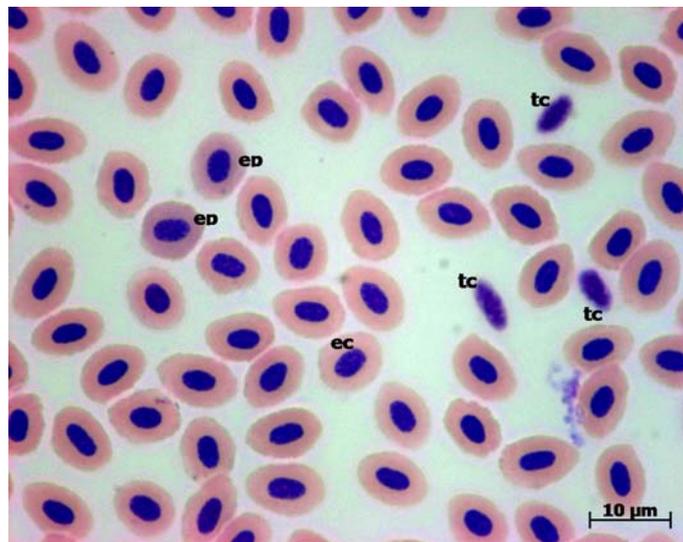


Figura 52. Micrografía de extensión sanguínea de *S. sagax*. Se observan trombocitos (tc) ovalados, eritrocitos (ec) y eritrocitos policromatófilos (ep). Técnica de Romanowsky. Aumento 1000X.

Tabla 23. Principales características morfológicas de las células sanguíneas de *S. sagax*.

Tipo de célula	Forma de célula	Núcleo	Citoplasma
Eritrocito policromatófilo	ligeramente redondeada	central, elíptico, basófilo y cromatina laxa	ligeramente basófilo
Eritrocito	ovalada	central, ovalado, basófilo, cromatina compacta	perdida de la basofilia
Neutrófilo	redondeada	periférico, puede presentar hasta 4 lóbulos	Claro, con gránulos muy finos con escasa coloración
Eosinófilo	redondeada	periférico, redondeado o ligeramente ovalado	presenta gránulos eosinófilos
Basófilo	redondeada	periférico, redondeado o ligeramente ovalado	Presenta gránulos basófilos grandes
Linfocitos	redondeados o ligeramente ovalados	Basófilo, cromatina ligeramente laxa	escaso citoplasma ligeramente basófilo
Monocitos	Generalmente redondeados, algunos de forma irregular	Periférico, basofílico, con cromatina laxa en células maduras	de aspecto hialino, presenta vacuolas
Trombocitos	redondeados, ovalados o espiculados	Basófilo, con cromatina compacta y heterogénea	prácticamente no presentan citoplasma

#### 5.4. CONTEOS DIFERENCIALES DE LEUCOCITOS.

Se obtuvieron los conteos diferenciales de leucocitos de 42 hembras de diferentes temporadas reproductivas. En estos conteos los leucocitos se dividieron en linfocitos, granulocitos (agrupando a eosinófilos y basófilos), granulocitos neutrófilos y monocitos. Los linfocitos fueron los más abundantes, con rangos entre 57 y 96.5%, con un valor promedio de 80.6% ( $\pm 10\%$ ). Le siguieron los granulocitos neutrófilos con un rango desde 0 hasta 28.4% y un promedio de 9.6% ( $\pm 7.7\%$ ); los granulocitos eosinófilos y basófilos representaron el 7.3% ( $\pm 5.4\%$ ) y un rango de 0.8 hasta 24%. Los monocitos fueron los más escasos, constituyeron el 2.5% ( $\pm 2\%$ ) en un rango desde 0 hasta 7% (Figura 53).

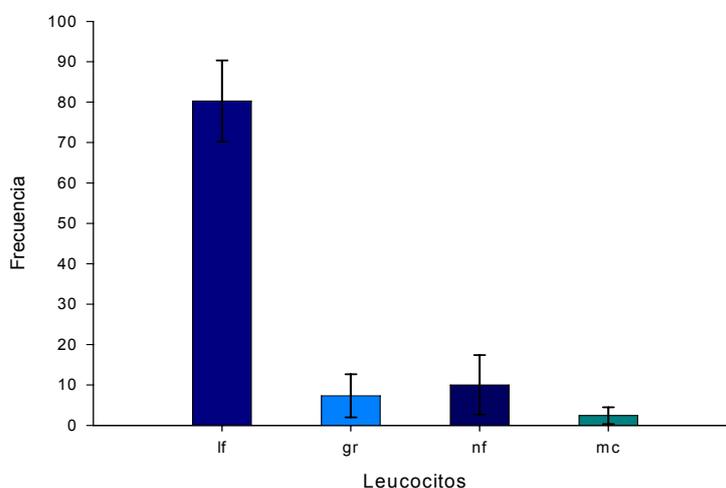


Figura 53. Frecuencia de los diferentes tipos de leucocitos en los conteos diferenciales. lf: linfocitos; gr: granulocitos; nf: neutrófilos; mc: monocitos.

#### 5.5. FACTOR DE CONDICIÓN ASOCIADO A PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS.

##### 5.5.1. RELACIÓN DEL FACTOR DE CONDICIÓN Y HEMATOCRITO.

El análisis en conjunto de los datos de hematocrito y factor de condición demostró que existe una correlación significativa entre dichos indicadores (Figura 54). El diagrama de dispersión demostró que los datos se agruparon por mes de muestreo. La correlación entre Hc y FC para cada mes de muestreo mostró una tendencia a una relación inversa, a excepción de abril de 2003, marzo de 2004 y febrero de 2006. Los valores de correlación más altos se observaron en diciembre de 2004 y enero de 2005. Sin embargo en ningún mes de muestreo fue significativa la correlación (Tabla 24).

Tabla 24. Parámetros de la correlación de Hc-FC agrupados por mes de muestreo de las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.

	N	a	b	r	p
Feb-03	6	53.3801	-655.7052	-0.0126	0.9812
Abr-03	16	51.889	63.2803	0.0133	0.9611
Feb-04	6	64.7073	-6880.874	-0.1878	0.7215
Mar-04	42	18.041	3069.2477	0.1577	0.3186
Dic-04	27	68.5283	-744.9988	-0.2495	0.2096
Ene-05	21	92.927	-1024.5318	-0.3241	0.1518
Mar-05	9	75.9209	-6060.1949	-0.1166	0.7651
Feb-06	14	47.7512	3960.524	0.0418	0.8871

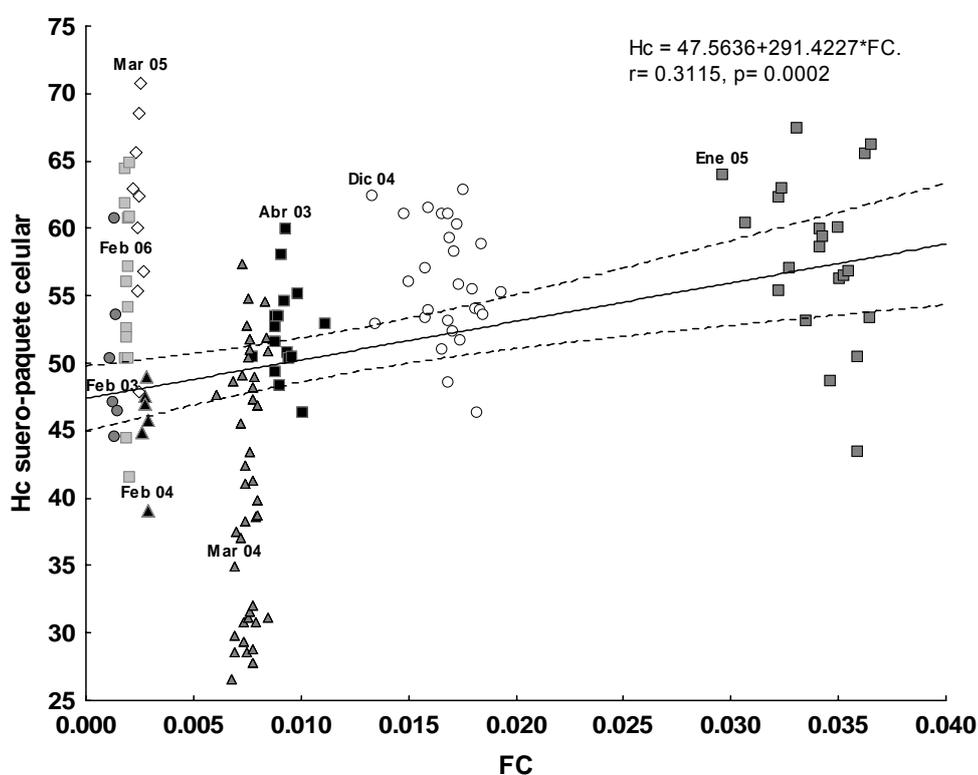


Figura 54. Diagrama de dispersión del factor de condición (FC) y hematocrito (Hc) durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006.

#### 5.4.2. RELACIÓN DEL FACTOR DE CONDICIÓN Y CONTEOS DE LEUCOCITOS.

Los conteos de leucocitos solo se pudieron realizar en algunos ejemplares de diciembre de 2004, enero y marzo de 2005 y febrero de 2006. El FC presentó el valor más alto en enero de 2005 y el más bajo en febrero de 2006. Los diferentes grupos de células de la serie blanca presentaron una variación amplia (figura 55), no se encontraron diferencias significativas ( $p=0.984$ ) en los conteos de leucocitos para cada mes de muestreo, por lo que

se considero que no hubo una relación entre los conteos diferenciales y los valores de factor de condición.

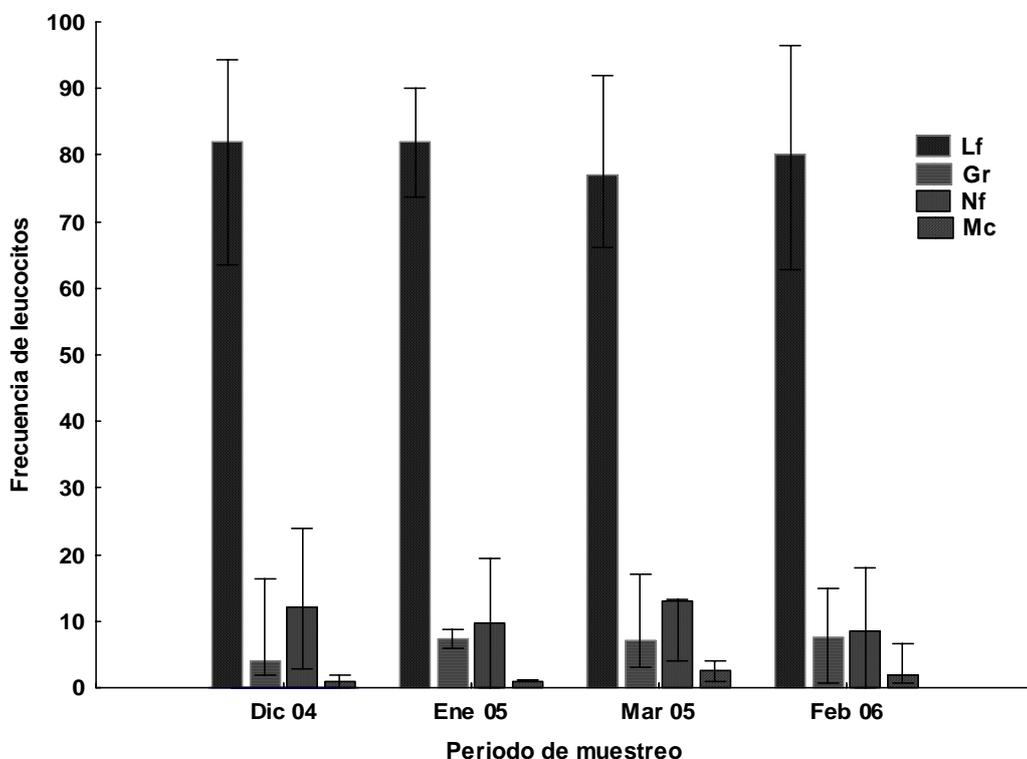


Figura 55. Frecuencia de conteos diferenciales de leucocitos en la temporada reproductiva de 2005 y 2006. La barra representa el valor promedio y la línea la desviación estándar.

## 6. VARIACIONES DE LOS INDICADORES DURANTE LAS TEMPORADAS REPRODUCTIVAS DE 2003 A 2006.

Con la información obtenida se pudo comprobar que durante el periodo de estudio hubo variaciones en los indicadores morfofisiológicos, con los cuales se demostró que en las temporadas reproductivas de 2003 y 2005 el proceso de maduración gonádica se vio interrumpida (Figura 56). En el caso de febrero de 2003 se registraron valores bajos de  $E_2$ ,  $Ca^{2+}$ , FC e IGS y altos de Hc. El análisis histológico demostró que en este mes las hembras capturadas se encontraron en atresia en estadios de desarrollo del oocito muy tempranos. En marzo de 2005 los valores de  $E_2$ ,  $Ca^{2+}$  y FC decrecieron y el HC incremento. El valor de IGS indicaba crecimiento de la gónada, sin embargo la morfología de los oocitos mostraba evidencia de que estos habían entrado en atresia en estadios avanzados de desarrollo, lo cual correspondía a los valores bajos de los indicadores fisiológicos. Estos dos eventos pudieron ser comparados con febrero y marzo de 2004 y febrero de 2006 en donde las

condiciones para la madurez gonádica presentaron valores altos respecto a febrero de 2003 y marzo de 2005.

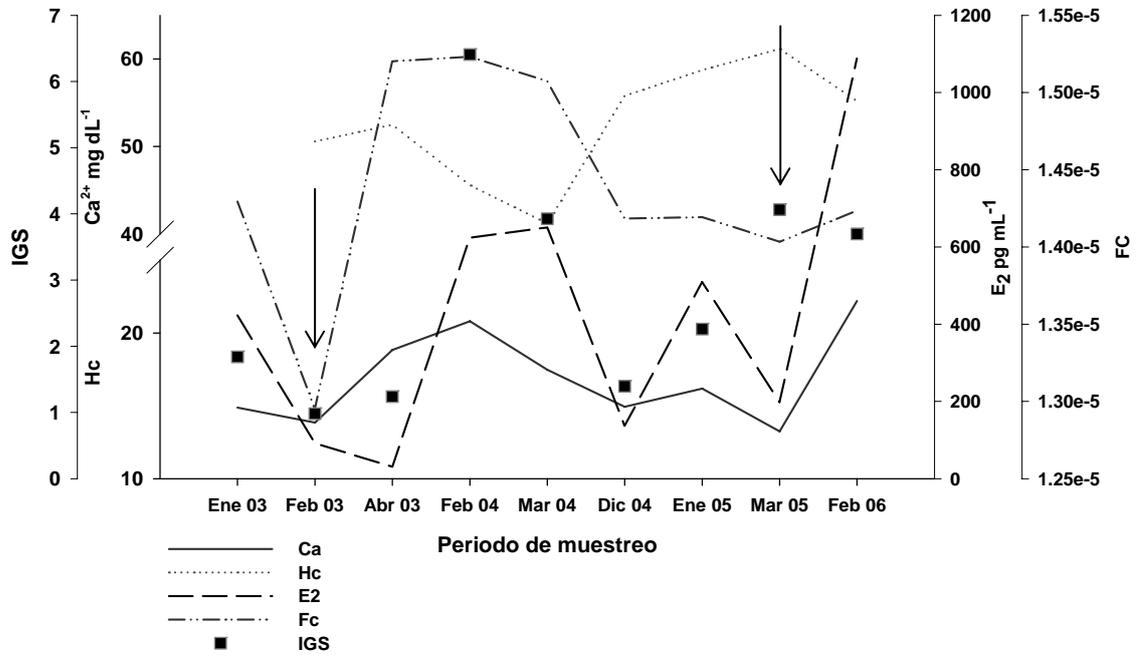


Figura 56. Variaciones de los indicadores morfofisiológicos asociados a la madurez gonádica de *S. sagax* durante las temporadas reproductivas de 2003 a 2006. Las flechas señalan los meses en los que se observó la presencia de atresia masiva y la caída de los indicadores fisiológicos.

## DISCUSION.

En la reunión celebrada en Noruega en el 2001, "Modern approaches to asses maturity and fecundity of warm-and cold-water fishes and squids", (Anónimo, 2001), se recomendó el uso de indicadores o características morfológicas asociadas al desarrollo del oocito, que permitan hacer comparaciones entre las escalas de madurez propuestas por diferentes autores. Esto permitió la comparación del desarrollo del oocito de la sardina monterrey con el de otros teleósteos. Por esta razón, la caracterización a nivel microscópico del desarrollo del oocito de la sardina monterrey *S. sagax*, asociada al seguimiento de la función hormonal que regula la producción gametogénica, fue la base de esta investigación. Se comprobó que el desarrollo del oocito en la sardina monterrey presenta el mismo patrón de crecimiento reportado en otras especies de teleósteos, tanto marinas (Mayer *et al.* 1988; Kjesbu *et al.* 1996; Ochoa-Báez, 1998; Rideout *et al.* 1999; Tomkiewics *et al.*, 2003) como dulceacuícolas (Coward y Bromage, 1998), dividiéndose en crecimiento primario, crecimiento secundario y maduración.

Durante cada estadio de desarrollo se presentaron cambios morfológicos, que fueron particulares a cada estadio y corresponden a eventos fisiológicos específicos. Durante la fase de crecimiento primario las oogonias se identificaron como nidos de células. Se ha sugerido que los grupos de oogonias siempre están presentes para el reclutamiento, lo cual es importante en especies con desoves múltiples (Coward y Bromage, 1998). En el estadio de oocitos perinúcleolares el desarrollo del oocito se hizo evidente por el cambio en el número y forma de los núcleolos, lo cual esta asociado a la acumulación de sustancias como ARNs y proteínas (Wallace y Selman 1981; Tyle y Sumpter 1996; Ochoa-Baéz, 1998).

En *S. sagax* la presencia de los alvéolos corticales correspondió a las descripciones hechas por Ochoa-Báez (1998) para *Engraulis encrasicolus* y por Motta *et al.* (2005) que caracterizaron los alvéolos corticales en diferentes especies del género *Trematomus* y *Cryodraco*, encontrando diferencias en su composición bioquímica entre especies. No obstante estas diferencias, mencionan que el desarrollo de estas inclusiones se observó en la misma zona del oocito en que se ha descrito en otras especies de peces óseos, próximas a la envoltura vitelina. El papel de los alvéolos corticales es el de evitar la poliespermiación, liberando su contenido en el momento de la fertilización al darse la reacción cortical (Wallace y Selman 1981; Billard 1992, Tyle y Sumpter 1996).

Se observó la presencia de las inclusiones lipídicas en la sardina monterrey de forma conjunta con pequeñas inclusiones que dadas sus características a los colorantes de la tinción pueden ser consideradas como los primeros gránulos de vitelo. En *D. labrax*, la acumulación de las inclusiones lipídicas, que están compuestas por lípidos insaturados, se da de manera conjunta con los primeros gránulos de vitelo, que difieren en su morfología, propiedades de tinción y composición química. La aparición de ambas inclusiones marca el inicio de la vitelogénesis endógena y después de haberse completado la acumulación de los lípidos, se inicia inmediatamente la vitelogénesis exógena (Mayer et al 1988).

Para el estadio de vitelogénesis, en este trabajo se hizo una división de la vitelogénesis en inicial y avanzada, aunque diferentes autores generalmente la dividen en tres etapas (Mayer et al. 1988; Coward y Bromage, 1998; Matsuyama et al. 1991; Tyler y Sumpter, 1996). Tyler y Sumpter (1996) mencionaron que es en esta fase donde el oocito puede alcanzar hasta el 95 % de su diámetro final en especies que desovan en nidos o sustratos, mientras que en especies con huevos pelágicos el crecimiento del oocito por la vitelogénesis solo representa entre el 11 % y el 40% de la talla final.

Una característica morfológica particular en esta especie fue lo que se denominó estadio de células granulosa columnares. Esta característica no ha sido reportada en otras especies de teleósteos o no se ha considerado como un estadio de desarrollo del oocito, en otros trabajos que han hecho descripciones histológicas del oocito de *S. sagax*. Torres-Villegas (1997) menciona que durante el crecimiento de estas células se da una acumulación de material acuoso hialino en su interior, describiéndolo como un cambio citológico importante, considerándolo parte del estadio de hidratación temprana. Así mismo, menciona que esta etapa del proceso de maduración del oocito es una señal de que las hembras han iniciado un proceso que concluirá con la ovulación.

Los estadios de proteólisis, núcleo migratorio e hidratación fueron la parte final del proceso de crecimiento del oocito. En esta fase de crecimiento, los estadios se sucedieron de una forma más discreta. La fusión de las inclusiones lipídicas durante la proteólisis se vio acompañada por cambios en la morfología del núcleo. Torres-Villegas (1997), menciona que el cambio en la forma del núcleo y los nucleolos son indicios del proceso de hidratación, junto con la desaparición de la membrana nuclear. Aun antes de concluir la fusión de las inclusiones lipídicas se pudo observar en algunas hembras el proceso de migración nuclear.

Al mismo tiempo ya se podían observar gránulos de vitelo fraccionados en el polo vegetal, indicador de la fusión del vitelo. Este proceso parece ser común en especies asincrónicas que presentan desoves múltiples, como *Paralabrax maculatofasciatus* (Ocampo-Cervantes, 2002) y *Gadus morhua* (Kjesbu *et al.*, 1996), en las que se observaron las mismas características del proceso de maduración final del oocito.

El ciclo del ovario durante la temporada de puesta concluye con la presencia de los FPO, que fueron la evidencia directa del desove. La morfología fue muy similar a la descrita para *E. encrasicolus* (Ochoa-Baéz, 1998). De las cuatro fases propuestas para la anchoa europea, solo pudieron ser identificados los PO del día 1 al 3, ya que los de día 0 no se observaron en las hembras de sardina monterrey recolectadas durante las diferentes temporadas reproductivas. Otro componente del ciclo ovárico fueron las atresias. En la sardina monterrey se observó la presencia de atresia masiva en dos temporadas reproductivas. En una de las temporadas ocurrió principalmente en hembras con estadios tempranos del desarrollo del oocito, mientras que en la otra se observó en hembras que habían iniciado el proceso de vitelogénesis. Diversos autores mencionan que la presencia de dichas estructuras son más frecuentes al final de la temporada reproductiva, sin embargo, la atresia puede presentarse cuando las condiciones para la reproducción se ven modificadas por algún factor ambiental (Trippel y Harvey, 1990; Kjesbu *et al.*, 1991; Rideout *et al.*, 2000; Rideout *et al.*, 2005; Torres-Villegas *et al.*, 2007)

Patiño y Sullivan (2002) y Grier (2002) discutieron sobre la inconsistencia que existe en la utilización de diferentes estadios del crecimiento folicular y del oocito, pudiendo utilizar dichas terminologías para describir procesos fisiológicos y celulares más que estadios de desarrollo, los cuales pueden ser específicos para cada especie. El uso de estas terminologías puede servir de referencia en cuanto a tratar de relacionar variaciones de los ciclos hormonales con los cambios morfológicos del oocito, que fue la finalidad del presente estudio. En este sentido, la asociación de los cambios morfológicos durante el desarrollo del oocito con los niveles de estradiol y calcio en suero sanguíneo proporcionó resultados que permitieron aportar información sobre la fisiología reproductiva de la sardina monterrey.

En el caso del estradiol se observó que hay una relación directa entre los niveles de la hormona y el estadio de desarrollo del oocito de *S. sagax*. Durante los estadios iniciales de desarrollo del oocito se encontraron niveles de estradiol bajos, lo cual concuerda con lo

descrito en especies como *D. labrax* (Prat *et al.*, 1990, Asturiano *et al.*, 2000), *S. melanostictus* (Matsubara *et al.*, 1995) y *Pleuronectes platessa* (Scout *et al.*, 1998). Sun y Pankhurst (2004) mencionan que en los estadios previtelogénicos la acumulación de sustancias proviene de fuentes diferentes a las vitelogeninas y de la formación de los cuerpos de Balbiani y su crecimiento es independiente al nivel de hormonas esteroideas circulantes.

La agrupación de los oocitos y su posterior asociación con los niveles de estradiol en suero sanguíneo mostró una amplia variación. Sin embargo, se pudieron definir intervalos que estuvieron asociados con los cambios morfológicos en el oocito en sus diferentes estadios de desarrollo. Se observó en el estadio de inclusiones lipídicas la presencia de pequeños gránulos que por su coloración corresponderían a los primeros gránulos de vitelo. Por lo tanto se podría considerar que en este estadio comienza a haber un efecto hormonal en los oocitos. En el caso de la sardina monterrey los niveles de estradiol incrementaron en el estadio de inclusiones lipídicas con un valor promedio de 189.45 pg ml<sup>-1</sup>, lo cual concuerda con lo reportado por Matsubara *et al.* (1995) en *Sardinops melanostictus*, en la cual los niveles críticos a los que se promueve la síntesis de vitelogénesis se encontraron entre los 117 y 300 pg ml<sup>-1</sup>.

Conforme ocurrió el desarrollo de los oocitos los niveles de estradiol en suero sanguíneo también incrementaron. A partir del estadio de vitelogénesis inicial los niveles aumentaron, alcanzando el valor máximo en el estadio de proteólisis. La separación de las hembras que presentaron evidencias de desove por la presencia de FPO permitió demostrar que después de ocurrido el desove los niveles de estradiol fueron mas altos que en hembras no desovadas. Por otro lado, los niveles de estradiol en los estadios de células granulosas columnares y proteólisis no deberían de ser mas altos que en los estadios de vitelogénesis, ya que en estos estadios el proceso de acumulación de vitelo debería de haber concluido, principalmente en el estadio de proteólisis. Murayama *et al.* (19994), mencionan que los oocitos que han completado la acumulación de vitelo no producen estradiol y los niveles de 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -diOH-P incrementan para promover la maduración final y la ovulación.

La presencia de diferentes grupos de oocitos en los desovadores múltiples o asincrónicos es la razón por la cual los niveles de estradiol se mantienen elevados aun en estadios de desarrollo tan avanzados. El análisis histológico de los ovarios de *S. sagax* permitió

comprobar que en hembras con estadios de células granulosas y proteólisis el grupo de oocitos que les precedían se encontraban generalmente en vitelogénesis inicial, mientras que en hembras con FPO, núcleo migratorio e hidratación el grupo de oocitos que les precedían se encontraban en estadio de vitelogénesis avanzada. Las observaciones hechas en otras especies de peces asincrónicos como *S. melanostictus*, *Gadus morhua*, *Alburnus alburnus*, *Rutilus rutilus*, *Blicca bjoerkna*, *D. labrax* y *Rhombosolea tapirina*, han demostrado que los niveles de estradiol se mantienen elevados durante la temporada reproductiva, incluso si se ha llevado a cabo el desove. Esto se debe a que el reclutamiento de oocitos es un proceso continuo y que los niveles hormonales se mantienen altos, en este caso el estradiol, para mantener la producción de vitelogeninas que serán utilizadas por el siguiente grupo de oocitos (Murayama *et al.*, 1994; Kjesbu *et al.*, 1996; Rinchard *et al.*, 1997; Asturiano *et al.*, 2000; Sun y Pankhurst, 2004).

Las variaciones de los niveles de estradiol asociados al estadio del desarrollo del oocito también se vieron influenciadas por otros factores. El seguimiento de las variaciones en las concentraciones de estradiol en la sardina monterrey permitió demostrar que existen variaciones en las concentraciones de estradiol en diferentes escalas de tiempo: en el ciclo circadiano, a lo largo de la temporada reproductiva y entre temporadas reproductivas. En la sardina japonesa, *S. melanostictus*, Murayama *et al.* (1994) mencionan que las concentraciones altas de estradiol se presentaron previo al incremento de la  $17\alpha, 20\beta$ -diOH-P, lo cual ocurre entre las 20:00 y 23:00 horas.

Las concentraciones bajas observadas en las temporadas reproductivas del 2003 y 2005 estuvieron relacionadas con problemas en la madurez gonádica. En el 2003 las concentraciones de estradiol fueron particularmente bajas y se asociaron a hembras que no presentaron desarrollo gonádico, manteniéndose los ovarios con oocitos en crecimiento primario y con presencia de atresias foliculares en esta fase de crecimiento, mientras que en el 2005 las hembras si presentaron cierto grado de madurez gonádica, evidenciado por la presencia de oocitos en estadios avanzados de vitelogénesis, asociándose nuevamente este evento con la presencia de hembras en atresia folicular masiva. Aunado a esto, también hay una influencia de la edad de los organismos, ya que se ha demostrado que en hembras que maduran por primera vez las concentraciones de esteroides sexuales generalmente no alcanzan los niveles adecuados para llevar a cabo la maduración gonádica (Sumpter, 1997;

Scout *et al.*, 1998; Lethimonier *et al.*, 2000; Jalabert *et al.*, 2000; Linares-Casaenave *et al.*, 2003; Sun y Pankhurst, 2004; Jalabert, 2005).

La presencia de hembras con atresia masiva permitió determinar cuales eran las concentraciones de estradiol bajo dos condiciones diferentes. En febrero de 2003 las hembras presentaron oocitos en estadios de desarrollo temprano con atresia. En este caso los valores fueron menores a  $100 \text{ pg ml}^{-1}$ . En marzo de 2005 las hembras alcanzaron el proceso de vitelogénesis, sin embargo se observó la presencia de atresia masiva con concentraciones de estradiol cercana a los  $400 \text{ pg ml}^{-1}$ . En especies como *D. labrax* (Asturiano *et al.*, 2000), *Pagrus pagrus* (Kokokiris *et al.*, 2000), *Maccullochella peelii peelii* (Newman *et al.*, 2007) y *Solea senegalensis* (García-López *et al.*, 2007), bajo condiciones de cultivo, se ha reportado que la presencia de atresia esta relacionada con el final de la temporada reproductiva y coinciden con concentraciones bajas de estradiol, muy similares a las observadas en estadios de desarrollo tempranos del oocito. Torres-Villegas *et al.* (2007) consideran un valor normal de 2% de atresia durante la temporada reproductiva de *S. sagax*, y este valor llega hasta un 5% al final de la temporada reproductiva, considerando como atresia mayor cuando más del 50% de los oocitos presentan las características de reabsorción.

El uso del  $\text{Ca}^{2+}$  como indicador asociado al crecimiento del oocito presentó una tendencia parecida al estradiol. Los valores promedio asociados a los diferentes estadios de desarrollo mostraron incrementos conforme el oocito maduró. La amplia variación observada en los diferentes estadios de desarrollo del oocito supondría que no existe una relación directa entre las concentraciones de calcio en suero y el desarrollo del oocito. Sin embargo, se observó un comportamiento similar al ocurrido con el estradiol: los niveles de calcio fueron más altos en las hembras que presentaron de manera conjunta oocitos vitelogénicos y FPO que en aquellas que no presentaron evidencias de desove y presentaban oocitos en alguna etapa de la vitelogénesis. Es importante considerar también que las concentraciones en los niveles de estradiol variaron en un orden de magnitud, mientras que el calcio se mantuvo en el mismo orden, por lo que las variaciones en la concentración de calcio no fueron tan marcadas como el estradiol.

El calcio se ha utilizado como un indicador fisiológico relacionado con la vitelogénesis debido a que es un componente obligado en la vitelogenina, pudiendo ser evaluado como calcio

total o como proteínas fosforiladas. Linares-Casenave *et al.*, 2003, mencionan que en *Acipenser transmontanus* los niveles de calcio pueden verse enmascarados por otras proteínas transportadoras que contengan calcio y por la variación individual en el calcio libre en plasma. El incremento de las concentraciones de calcio en plasma lo reportan al inicio de la vitelogénesis, mencionando que estas se mantienen altas, sin presentar diferencias desde la vitelogénesis inicial hasta la migración nuclear. En *Salmo salar* se ha demostrado que existe una fuerte relación entre los niveles de calcio total en plasma y el crecimiento ovárico, que coinciden con la síntesis de vitelogeninas. Durante este proceso Persson *et al.* (1998), observaron una concentración constante de calcio y una acumulación de este en los oocitos conforme estos maduraban, sugiriendo que la remoción de calcio del fluido celular debería de ser compensado. Por un lado sugieren la utilización de fuentes endógenas, demostrado por la reabsorción de escalas que coinciden con el crecimiento del ovario y por otro lado, sugieren que es posible que también incorporen calcio del medio ambiente, sin embargo, el uso de cualquiera de estas dos fuentes estarán en función de su disponibilidad y del costo energético que implique su movilización.

En el caso de los desovadores múltiples los mecanismos de incorporación de calcio en los ovarios no ha sido tan detallado. Rinchard *et al.* (1997) hicieron una comparación de las variaciones en las concentraciones de proteínas fosforiladas en *Rutilus rutilus* como desovador total y *Alburnus alburnus* y *Blicca bjoerkna* como desovadores asincrónicos. Las diferencias observadas entre los dos tipos de desovadores radicaron en el tiempo de permanencia de las proteínas asociadas al calcio en el suero sanguíneo. En el desovar total los niveles de las proteínas asociadas al calcio incrementaron junto con los niveles de vitelogeninas, pero decrecieron de manera más rápida que estas últimas. Los desovadores asincrónicos presentaron diferencias: en *A. alburnus* los niveles de proteínas decrecieron de manera gradual después de concluir la acumulación de vitelo en los oocitos, mientras que en *B. bjoerkna* los niveles se mantuvieron altos durante toda la temporada reproductiva, lo cual indicaba un reclutamiento sostenido de oocitos para nuevos desoves, asociando estas diferencias con la capacidad de producir nuevos desoves en cada especie. La producción constante de oocitos en la sardina monterrey durante la temporada reproductiva explica entonces el por que de niveles altos de estradiol y calcio en estadios avanzados de desarrollo, como la proteólisis, y después de ocurrido el desove, que en este caso fue evidenciado por las presencia de FPO.

El hematocrito presentó relación inversa con el estadio de desarrollo del oocito. En este caso los niveles de hematocrito altos se asociaron a estadios de desarrollo tempranos, mientras que su disminución correspondió a estadios de madurez avanzados. Esta relación fue notable en hembras que en presentaron de manera conjunta FPO y oocitos en vitelogénesis inicial. Los resultados obtenidos mostraron un descenso progresivo desde la vitelogénesis inicial hasta el estadio de proteólisis. En hembras con oocitos hidratados el hematocrito incrementó, lo que sugiere que los fluidos necesarios para los oocitos se han acumulado y los niveles de suero vuelven a recuperarse. Los valores menores del hematocrito en estas hembras podrían deberse a que durante el proceso de maduración del oocito se requiere de la acumulación de fluidos, lo que le confiere la flotabilidad a los huevos pelágicos (Tyler y Sumpter, 1996). Torres-Villegas (1997), menciona que en los ovarios de la sardina monterrey se acumula una gran cantidad de material mucoso en hembras próximas al desove.

Existe poca información en la que se aborde la relación entre el hematocrito y la maduración del ovario. En especies como *Salmo gairdneri* (Lane, 1979), *Tinca tinca* (Guijarro *et al.*, 2003), *D. labrax* (Kavadias *et al.*, 2004), *Thunnus maccoyi* (Rough *et al.*, 2005) e *Ictalurus punctatus* (Tavares y Moraes, 2007) se han reportado variaciones estacionales en los niveles de hematocrito, relacionando estos cambios con diferentes condiciones de los organismos. Dentro de estas condiciones se encuentra el estado nutricional, la edad y el estado de estrés de los organismos. Rough *et al.* (2005) mencionan que en organismos silvestres de *Thunnus maccoyi* las variaciones en el hematocrito se vieron afectadas por las condiciones del muestreo, ya que en condiciones de estrés puede ocurrir la liberación de células sanguíneas del baso e incrementar el hematocrito hasta un 60% después de media hora de la captura. Es posible que esto ocurra de igual manera en la sardina monterrey, ya que el proceso de captura en la pesca industrial implica un fuerte estrés para los organismos, sin embargo, los resultados encontrados demostraron que si hay una relación entre los niveles de hematocrito y el estadio de desarrollo del oocito.

Cada uno de estos indicadores fisiológicos permitió establecer cierta relación con el estadio de desarrollo del oocito, a través de los cuales se identificaron alteraciones en el proceso de maduración gonádica. No obstante, estos indicadores se ven modificados por las características de los individuos, que también pudieron ser utilizados como indicadores de la reproducción de la sardina monterrey.

La presencia de atresia folicular en dos periodos reproductivos permitió observar condiciones diferentes en el proceso reproductivo de la sardina monterrey. En febrero de 2003 se observó la presencia de hembras con atresia folicular masiva en estadios de desarrollo tempranos, mientras que en marzo de 2004 las hembras habían entrado en vitelogénesis avanzada, observándose la atresia masiva en estos estadios. Rideout et al. (2005) mencionan que existen 3 eventos diferentes en la supresión del proceso reproductivo, dependiendo en que fase del ciclo normal de madurez gonádica se presente. Estas tres condiciones son inactividad del ovario, la reabsorción y la retención de los oocitos. En el caso de la sardina monterrey se pudieron identificar los dos primeros casos. En 2003 se identificaron hembras con ovarios en inactividad puesto que no hubo crecimiento de los oocitos y en 2004 ocurrió la reabsorción de oocitos en vitelogénesis. En ambos casos los indicadores fisiológicos fueron diferentes a aquellos que se observaron en hembras en las que el proceso de maduración se consideró normal.

Pero no solo los indicadores fisiológicos fueron diferentes. Las temporadas reproductivas en las que se registró la atresia masiva se caracterizaron por la presencia de hembras que se encontraban por debajo de la talla de primera madurez, lo cual implica diferencias en la fisiología de los ejemplares, considerando que animales de tallas pequeñas son de menor edad que organismos de tallas grandes. En este estudio se observaron cambios en las frecuencias de tallas: en 2003 y 2005, en los que las tallas fueron pequeñas con un intervalo reducido, mientras que en 2004 y 2006 la talla incrementó y el intervalo de frecuencias fue más amplio. Aun con las variaciones observadas, las tallas de los ejemplares muestreados se encontraron dentro de los intervalos reportados por los diferentes autores para la misma zona de estudio. En Bahía Magdalena se ha demostrado que existe una sucesión de la frecuencia de tallas en diferentes temporadas reproductivas (Félix-Uraga, 1986; Félix-Uraga y Ramírez-Rodríguez, 1986; Torres-Villegas *et al.*, 1995; Torres-Villegas *et al.*, 1997; Hernández-López, 2003), con un intervalo de 75 a 215 mm de longitud patrón.

El uso de algunas características morfométricas como la relación peso-longitud y el factor de condición se han asociado principalmente con la reproducción, el crecimiento y cambios en el ambiente. Esto se ha demostrado en *Trachurus mediterraneus* (Šantić et al., 2006), *Engraulis encrasicolus* (Sinovčić, 2004; Basilone et al, 2006), *Trachurus symmetricus*, *Scomber japonicus*, y *Engraulix mordax* (Parrish y Mallicoate, 1995). En estas especies la relación peso-longitud y el factor de condición decrecieron cuando alcanzaron los periodos

de mayor actividad reproductiva y conforme concluía dicha actividad mejoraron su condición. Estas características, empleadas como indicadores del bienestar de los organismos, también presentaron cambios en las temporadas en las que se identificó la supresión del proceso de maduración ovárica de la sardina monterrey. Es pertinente señalar que no siempre se encontró una relación tan clara entre estos indicadores. Se observó en algunos casos, como en la temporada reproductiva de 2005, antes de observar la presencia de atresia masiva, organismos de talla y peso bajos que presentaron un factor de condición alto. Patterson (1992) demostró en *Sardinops sagax* una relación entre el factor de condición y la actividad reproductiva, sin embargo encontró casos en los que se dio una mejora en la condición de los organismos dentro del periodo reproductivo, lo cual menciona que es difícil de explicar y lo atribuye a la hidratación de la gónada. En su estudio menciona que tampoco hay una relación simple que explique los cambios anuales del factor de condición y su relación con los cambios oceanográficos, a diferencia de otros autores en los que esta relación es directa (Parrish y Mallicote, 1995).

Buscar relaciones directas entre parámetros biológicos de una especie, ya sea el factor de condición, indicadores de actividad reproductiva o el reclutamiento de nuevos organismos, con factores abióticos, como surgencias o cambios ambientales, a menudo llevan a resultados que no presentan una relación clara o fácil de explicar. Caso típico en la biología pesquera, y particularmente en los pelágicos menores, es el reclutamiento de nuevos organismos al stock. Diversos autores han tratado de demostrar una relación entre el tamaño del stock y la producción de nuevos organismos (Clark y Marr, 1955; Hempel, 1979; Kim *et al.*, 2006), suponiendo que las clases anuales grandes provienen de grupos desovantes grandes, mientras que las clases anuales pequeñas pueden ser producto de un stock de cualquier tamaño. En este tipo de hipótesis pocas veces se contempla la fisiología de los organismos y el papel que puede desempeñar en el tamaño de las poblaciones. Por ello es importante integrar esta información para tratar de establecer una mejor relación entre la reproducción y el reclutamiento de nuevos organismos (Murayama *et al.*, 1994; Kurita *et al.*, 2003). En este sentido, los indicadores morfofisiológicos utilizados en el presente estudio pueden ser una herramienta útil en cuanto a su aplicación en el seguimiento de la madurez gonádica de la sardina monterrey.

Se considera que el resultado más importante encontrado fue la presencia de atresia masiva en diferentes temporadas reproductivas, ya que las condiciones en las que se presentaron

fueron diferentes. De haberse hecho el seguimiento rutinario, utilizando el IGS como principal indicador de madurez, se habría llegado a conclusiones erróneas en su interpretación. En el 2003 los valores bajos de IGS indicarían que no hubo actividad gonádica, mientras que en 2005 se podría considerar que si la hubo. Chavira-Niño (2005) estableció una escala de IGS para la sardina monterrey con ejemplares obtenidos en Bahía Magdalena, encontrando que entre valores de 3 y 5 se considera a las hembras en plena madurez gonádica, sin embargo dentro de este intervalo reporta la presencia de hembras con atresias foliculares. Torres-Villegas (1997) menciona un rango de IGS entre 4 y 13, encontrando variaciones del IGS a lo largo de su periodo de estudio e identificando periodos de poca actividad gonádica. En ambos casos las escalas de IGS fueron validadas mediante análisis histológico de los ovarios. Sin embargo en otros estudios la valoración de la madurez gonádica solo se ha sustentado en el uso del IGS y de escalas morfocromáticas, reportándose actividad reproductiva de la especie durante todo el año en la misma zona de estudio (Hernández-López, 2003; Álvarez-Trasviña, 2008).

El hecho de encontrar dos temporadas en las cuales el proceso de maduración gonádica de se vio interrumpido, evidenciados por la presencia de atresia masiva mediante el análisis histológico, fue un indicador contundente de cambios en el proceso de maduración gonádica de la sardina monterrey. Al encontrarse inactividad ovárica en una temporada reproductiva y reabsorción de oocitos vitelogénicos en otra, que son dos eventos diferentes de supresión del proceso de maduración como lo señala Rideout et al. (2005), se puede suponer que las condiciones para completar el proceso de crecimiento y maduración de los oocitos no fueron las adecuadas. Por lo tanto, el esfuerzo fisiológico que implica la producción de oocitos no reportaría ningún beneficio para la especie.

Durante el periodo de estudio no se observó un desequilibrio en la proporción de sexos en *S. sagax* al que se le pudiese atribuir la presencia de atresia en cualquiera de las dos temporadas reproductivas, como en el caso de *Catostomus commersoni* (Trippel y Harvey, 1990), donde una mayor proporción de hembras debida a la remoción de los machos por efecto de la pesca, reporto una incidencia de atresia del 75%. Sin embargo, el FC si presentó cierta relación con la atresia: en 2003 el FC fue bajo durante toda la temporada reproductiva, sin embargo estos valores también fueron observados en las hembras de 2006, las cuales si alcanzaron la maduración gonádica. En la temporada reproductiva del 2005 el FC fue alto al inicio de la temporada, lo cual debería suponer un desarrollo gonádico normal. No obstante

el súbito descenso en el FC en marzo estuvo ligado a la presencia de atresia folicular masiva y a bajas concentraciones de estradiol. La presencia de atresia masiva se ha reportado en *Gadus morhua* en el medio natural y bajo condiciones experimentales (Kjesbu *et al.*, 1991; Rideout *et al.*, 2000;) relacionando la presencia de la atresia con deficiencias nutrimentales. Kurita *et al.* (2003), mencionan que el crecimiento del oocito y la fecundidad de *Clupea harengus* se ven afectados por la presencia de atresia y esta a su vez esta estrechamente relacionada con la condición corporal de las hembras.

La falta de alimento puede conducir a un estrés en los organismos que implique modificaciones fisiológicas. Se ha demostrado que en algunos peces pelágicos como *E. mordax*, es necesario que el organismo consuma de un 4 a 5 % de su peso por día de alimento para poder sostener el costo anual de crecimiento y reproducción (Hunter y Leong, 1981). En la sardina monterrey la temperatura es el factor ambiental que mas se ha relacionada con las variaciones en el FC y la reproducción (Lluch-Belda *et al.*, 1991; Torres-Villegas, 1997; Hernández-López, 2003; Lynn, 2003; Yatsu *et al.*, 2005; Robinson *et al.*, 2007), pero no hay reportes que señalen el efecto inmediato que pudiera tener la falta de alimento a corto plazo. La privación de alimento y el estrés generado podrían desembocar en alteraciones a nivel hormonal. En *Oncorhynchus mykiss*, bajo condiciones de estrés, los niveles altos de cortisol tienen un efecto inhibitorio en los receptores de estradiol en el hígado, ocasionando un descenso en los niveles de vitelogeninas en plasma y su consecuente efecto en el crecimiento de los oocitos (Lethimonier *et al.*, 2000). La proporción de hormonas proteicas que intervienen en el proceso de maduración del oocito también pueden verse afectadas.

El avance en las investigaciones sobre el papel de la atresia en el reclutamiento de oocitos y su relación con los factores ambientales ha llegado hasta niveles subcelulares para analizar las causas que regulan estos procesos. En *Solea senegalensis* se han encontrado cambios en las concentraciones de los receptores de vitelogeninas y de proteínas transportadoras de lípidos. Estos compuestos se encontraron en concentraciones altas en oocitos previtelogénicos, hígado y tejido adiposo y sus concentraciones decrecen conforme madura el ovario, pero en presencia de atresia folicular los niveles de ambos compuestos se mantienen altos (Agulleiro *et al.*, 2007). En *Liza ramada*, en condiciones experimentales y bajo estrés inducido, se observó que la proporción de activita e inhibina están estrechamente relacionadas con la presencia de atresia folicular. Se encontró una fuerte inmuno-reactividad

de activina beta cuando las células de la granulosa adquieren función fagocitaria, mientras que en oocitos con desarrollo normal la activina presento una mayor reacción (Mousa y Mousa, 2003).

En un intento por relacionar el proceso de maduración gonádica con indicadores mas finos del estado de bienestar de los peces fue que se hizo uso del hematocrito y de los conteos diferenciales de leucocitos, ya que su uso es una herramienta útil en la evaluación del estado de condición de los peces (Guijarro *et al*, 2003; Kavadias *et al*, 2004; Congleton y Wagner, 2006; Tavares y Moraes, 2007). De todos los parámetros reportados en la literatura solo pudieron ser evaluados el hematocrito y el conteo diferencial de leucocitos en *S.sagax* debido a las condiciones del muestreo. El hematocrito demostró ser un indicador crítico asociado al estadio de desarrollo del oocito, además de demostrar diferencias en la proporción suero-paquete celular al relacionarse este parámetro con los diferentes intervalos de tallas. Se ha demostrado que estas diferencias de los niveles de hematocrito con respecto a la edad influyen en el desempeño metabólico de los organismos, puesto que el volumen y densidad de las células sanguíneas determinan la eficiencia del transporte de oxígeno, además de la capacidad de osmorregulación que es menos eficiente en organismos jóvenes (Nespolo y Rosenmann, 2002). Estas observaciones llevarían a suponer que las hembras jóvenes de *S. sagax* tendrían prioridades en cuanto a necesidades metabólicas, más urgentes que la reproducción, lo cual podría estar relacionado con los problemas de maduración gonádica observados durante el periodo de estudio.

En cuanto a la relación de los conteos diferenciales de leucocitos con el FC, no fue posible establecer una asociación. Los conteos solo pudieron realizarse en hembras de dos temporadas reproductivas sin encontrarse diferencias significativas en los conteos. Sin embargo, esta bien establecido que ocurren cambios en los parámetros hematológicos, incluidos el hematocrito y los conteos diferenciales de leucocitos. Dichas variaciones están relacionadas con cambios en la alimentación, el estrés y la disponibilidad de recursos energéticos del organismo (Rios *et al.*, 2002; Guijarro *et al.*, 2003; Rough *et al*, 2005). En *D. labrax* los cambios en los parámetros hematológicos se han relacionado con el estado reproductivo, siendo mas notables las variaciones en las hembras que en los machos (Kavadias, *et al.*, 2004).

En la sardina monterrey los trabajos fisiológicos son escasos. Llegar a los niveles subcelulares con los que se puedan determinar cambios fisiológicos mas detallados permitirían asociar cambios en los procesos de maduración gonádica que afecten la producción de oocitos. Estas consideraciones han sido sugeridas ya por algunos autores, los cuales proponen el uso de marcadores moleculares para identificar los factores involucrados en la regulación del crecimiento folicular y su degeneración, además de considerar a la atresia en los modelos de evaluación de biomasa como un mecanismo de regulación de producción de oocitos y su asociación con factores endógenos como la condición de los organismos, los procesos hormonales y su relación con el ambiente (Kurita *et al*, 2003; Agulleiro *et al*, 2007; Gantias *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos en el presente estudio son una aproximación a un proceso sumamente complejo como es la reproducción, en el cual intervienen factores exógenos y endógenos que actúan en diferentes escalas de tiempo. No obstante, los indicadores morfofisiológicos relacionados al crecimiento del oocito y la madurez gonádica de la sardina monterrey pueden ser utilizados como indicadores endógenos del proceso de maduración gonádica, aunque aún es necesario realizar estudios que profundicen en estas relaciones. Caso particular es la presencia de atresia masiva y el papel que juega al presentarse durante los meses en los que se consideran de mayor actividad reproductiva, como mecanismo de regulación en la producción de oocitos y su efecto en el reclutamiento.

## CONCLUSIONES

- Los cambios celulares en el crecimiento del oocito de *S. sagax* durante las fases preovulatoria, postovulatoria y de atresia folicular, conservan una relación directa con la concentración de  $E_2$  y de  $Ca^{+2}$  en suero sanguíneo. De la misma manera sucedió para el hematocrito.
- Se concluye que los intervalos de concentración del estradiol entre  $140\text{pgml}^{-1}$  y  $240\text{pgml}^{-1}$  son indicadores del inicio de la acumulación de vitelo proteico en el ooplasma y se mantienen en el nivel superior durante los desoves parciales.
- La concentración de estradiol y de calcio, demostraron variaciones en el tiempo: anuales, mensuales y diarias. En el ciclo circadiano, dan evidencia de mayor actividad antes y después del desove. En los meses de reproducción, al inicio y al final de la temporada reproductiva, llegan al mínimo valor registrado.
- En las variaciones anuales, las concentraciones de estradiol y de calcio disminuyeron de manera notable, en las temporadas en que se encontró la presencia de atresia masiva. En tanto que el hematocrito se comporta de manera inversa.
- El hematocrito indica de manera directa y da evidencia de la puesta inmediata en el ciclo diario.
- El incremento del estradiol y calcio en la sangre en presencia de folículos postovulatorios simultáneos con oocitos en vitelogénesis inicial, se explica por el reclutamiento de los oocitos que conformaran el siguiente desove.
- Los indicadores endógenos en su totalidad están relacionados en alguna medida con la talla de los organismos. Por tanto, se concluye que la talla puede ser utilizada como otro indicador intrínseco.

- La composición de leucocitos conserva la estructura cualitativa y cuantitativa en los meses analizados, sin expresar de manera directa la condición de los organismos en las temporadas de reproducción analizadas.
- El hematocrito tiene una relación inversa con la talla y en consecuencia con la edad.
- Se concluye de manera general que los predictores endógenos empleados en su conjunto, pueden ser utilizados para inferir el estado de maduración ovárica de *Sardinops sagax* durante cualquier etapa del periodo reproductivo.

## RECOMENDACIONES.

- Es necesario una buena fijación de los organismos y del proceso histológico para poder hacer una adecuada interpretación y asignación del estadio de desarrollo de los oocitos.
- Las muestras de suero deben de ser procesadas lo más pronto posible para evitar alteraciones que modifiquen los resultados en las cuantificaciones de estradiol y calcio, de igual manera el hematocrito debe de cuantificarse antes de que ocurra la hemólisis, ya que esto afecta la relación suero-paquete celular.
- Sería recomendable incluir pruebas de bioquímica sanguínea y de incidencia de parásitos que permitan establecer una mejor relación entre los parámetros hematológicos y el factor de condición de los organismos.
- Aunque ya se han determinado algunos indicadores endógenos en las hembras con el presente estudio, es necesario realizar estos mismos estudios en los machos, de manera conjunta, para tratar de establecer si ambos sexos se ven afectados en su maduración gonádica cuando se presentan eventos extraordinarios como el caso de la atresia masiva en hembras.

## BIBLIOGRAFIA

- Agulleiro, M.J., M. André, S. Morais, J. Cerda y P. Babin. 2007. High transcript level of fatty acid-binding protein 11 but not of very low-density lipoprotein receptors is correlated to ovarian follicle atresia in a teleost fish (*Solea senegalensis*). *Biology of Reproduction*. 77: 504-516.
- Álvarez-Trasviña, E. 2008. Biología reproductiva de la sardina del Pacífico *Sardinops sagax* (Jenyns, 1824), en bahía Magdalena, durante 1981 a 2005. Tesis de Licenciatura. UABCS. México. 56 pp.
- Anónimo. 2001. Plenary document. Report of the working group on Modern approaches to assess maturity and fecundity of warm-and cold-water fishes and squids. O.S. Kjesbu, J.R. Hunter y P.R. Witthames Eds. 4-7 de septiembre, Bergen, Noruega. 7:10.
- Asturiano, J.F., L.A. Sorbera, J. Ramos, D.E. Kime, M. Carrillo y S. Zanuy. 2000. Hormonal regulation of the European sea bass reproductive cycle: an individualized female approach. *Journal of Fish Biology*. 56: 1155-1172.
- Balinsky, B.I. 1978. Introducción a la embriología. Ed. Omega, Barcelona. 644 pp.
- Baker, D.M., B. Davies, W. W. Dickhoff y P. Swanson. 2000. Insulin-like growth factor I increases follicle-stimulating hormone (FSH) content and gonadotropin-releasing hormone-stimulated FSH release from Coho Salmon pituitary cells in vitro. *Biology of Reproduction* 63: 865–871.
- Bakun, A. 1985. Comparative studies and the recruitment problem: searching for generalizations. *Calif. Coop. Oceanic Fish. Invest. Rep.* 26: 33-40.
- Barrell, G., L.A. Thrun, M.E. Brown, C. Viguié y F.J. Karsch. 2000. Importance of photoperiodic signal quality to entrainment of the circannual reproductive rhythm of the ewe. *Biology of Reproduction*. 63: 769-774.
- Basilone, G., C. guisande, B. Patti, S. Mazzola, A. Cuttitta, A. Bonanno, A.R. Vergara e I. Maneiro. 2006. Effect of habitat conditions on reproduction of the European anchova (*Engraulis encrasicolus*) in the Strait of Sicily. *Fisheries Oceanography*. 14 (4): 271-280.
- Bell G. 1980. The cost of reproduction and their consequences. *The American Naturalist*. 116 (1): 45-76.
- Billard, R. 1992. Reproduction in rainbow trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. *Aquaculture*. 100: 263-298.
- Borg B, J Peute, M Reschke, R van den Hunk. 1987. Effects of photoperiod and temperature on testes, renal epithelium, and pituitary gonadotropic cells of the threespine stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. *Can. J. Zool.* 65: 14-19.

- Bromage, N.; M. Porte y C. Randall. 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture*. 197, 63-98.
- Butler, J.L., M.L. Granados G., J.T. Barnes, M. Yaremko y B.J, Macewicz. 1996. Age composition, growth and maturation of the Pacific sardine (*Sardinops sagax*) during 1994. *CalCOFI Rep. V. 37*: 152-159.
- Bye, V.J. 1990. Reproductive seasonality in teleosts: environmental influences. 7. Temperate marine teleosts. (Munro, A.D.; Scott, A.P. y Lam, T.J. Editores). pp. 125-143. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Cannon, M. S.; H. H. Mollenhauer, T. E. Eurell, D. H. Lewis, A. M. Cannon, y C. Tompkins. 1980. An ultrastructural study of the leukocytes of the channel cat fish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of Morphology*. 164: 1-23.
- Carrillo, M. 1987. Fisiología de la reproducción de los peces y su aplicación a los cultivos marinos. En: Investigación acuícola en América Latina. Verte, J.A.J., M. Carrillo, S. Zanuy y E.A. Huisman Eds. IFS. 45-77.
- Carrillo M.; Zanuy S.; Oyen F.; Cerdá J.; Navas J.M.; Ramos J. 2000. Some criteria of the quality of the progeny as indicators of physiological broodstock fitness . En Recent advances in Mediterranean aquaculture finfish species diversification. Zaragoza : CIHEAM-IAMZ. p. 61-73 :
- Cerda, J., M. Carrillo, S. Zanuy, J. Ramos y M. de la Higuera. 1994. Influence of nutritional composition of diet on sea bass, *Dicentrarchus labrax* L, reproductive performance and egg and larval quality. *Aquaculture*. 128: 345-361.
- Chavira-Niño, M.A. 2005. Morfología microscópica de la gónada de la sardina monterrey *Sardinops sagax* (Pises: Clupeidae) con relación al índice gonadosomático en un ciclo anual. Tesis de licenciatura. UABCS. 61 pp.
- Clark, F. Y Marr, J.C. 1955. Population dynamics of the pacific sardine. *Mar. Ses. Comm. Calif. Coop. Oceanic Fish. Invest. Rep.* July 1953 - 31 March 1955. pp. 11-48.
- Coward, K. y N.R. Bromage. 1998. Histological classification of oocyte growth and the dynamics of ovarian recrudescence in *Tilapia zilli*. *Journal of Fish Biology* 53: 285-302.
- Craig, S.R., D.S. MacKensei, G. Jones y D.M. Gatlin III. 2000. Seasonal changes in the reproductive condition and body composition of free-ranging red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture*. 190: 89-102.
- De Vlaming, V.L. 1982. Patterns of oocyte development among teleosts. En *Control processes in fish physiology*. Edit. R. Dugan. Holt-Saunders, London. pp. 176-199.
- Fänge, R. 1992. Fish blood cells. En *Fish Physiology. The cardiovascular system*. W.S. Hoar, D.J. Randall y A.P. Farrell, Eds. V. XII B. 2:46.

- Félix-Uraga, R. 1986. Edad, crecimiento y estructura poblacional de *Sardinops sagax caerulea*, en Bahía Magdalena, durante 1981 a 1984. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN, La Paz, B.C.S. 103 pp.
- Félix-Uraga, R. y M. Ramírez-Rodríguez. 1986. Marcas periódicas en otolitos de *Sardinops sagax caerulea* y posibles relaciones con su reproducción, en Bahía Magdalena, B.C.S. México. *Inv. Mar. CICIMAR*. 3 (1): 20-28.
- Fitzpatrick, M.S.; Redding, J.M.; Ratti, F.D. y Schreck, C.B. 1987. Plasma testosterone concentration predicts the ovulatory response of coho salmo (*Oncorhynchus kisutch*) to gonadotropin-releasing hormone analogue. *Can. J. Fish. Aquat.* 44: 1351-1357.
- Froese, R. 2006. Cube law, condition factor and weight-length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology*. 22: 241-253.
- Fry F E J. 1971. The effects of environmental factors on the physiology of fish. En *Environmental relations and behavior. Fish Physiology*. W.S. Hoar y D.J. Randall Eds. Vol. VI, 1-87.
- Gallagher, P. y A. P. Farrell. 1998. Hematocrit and blood oxygen-carrying capacity. En *Fish Physiology. Fish Respiration*. 17: 185-226.
- Ganas, K., C. Nunes y Y. Stratoudakis. 2008. Use of late ovarian atresia in a describing spawning history of sardine, *Sardina pilchardus*. *Journal of Sea Reserch*. In press.
- García-López, A., V. Anguis, E. Couto, A.V.M. Canario, J.P. Cañavate, C. Sarasquete y G. Martínez-Rodríguez. 2006. Non-invasive assessment of reproductive status and cycle of sex steroid levels in a captive wild broodstock of Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup). *Aquaculture*. 254: 583-593.
- García-López, A., E. Couto, A. V.M. Canario, C. Sarasquete , G. Martínez-Rodríguez. 2007. Ovarian development and plasma sex steroid levels in cultured female Senegalese sole *Solea senegalensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146 A: 342–354
- Grier, H.J. 2002. The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. *Proc. Gulf Caribb. Fish. Inst.* 53: 537-552.
- Guijarro, A.I., M.A. Lopez-Patiño, M.L. Pinillos; E. Isorna, N. De Pedro, A.L. Alonso-Gómez, M. Alonso-Bedate, y M.J. Delgado. 2003. Seasonal changes in haematology and metabolic resources in the Tecnc.. *Journal of Fish Biology*. 63: 803-815.
- Haddyd, J. A. y N.W. Pankhurst. 2000. The effects of salinity on reproductive development, plasma steroid levels, fertilisation and egg survival in black bream *Acanthopagrus butcheriq*. *Aquaculture*. 188: 115-131.
- Ham, A.H. 1975. *Histologia*. Ed Interamericana. México. 935 pp.

- Hamers, R. 1995a. Granulation staining and cytochemistry of peripheral blood leucocytes in healthy carp (*Cyprinus carpio* L.) I: Granulocytes. *Journal of Applied Ichthyology*. 11: 86-93.
- Hamers, R. 1995b. Granulation staining and cytochemistry of peripheral blood leucocytes in healthy carp (*Cyprinus carpio* L.) II: Monocytes. *Journal of Applied Ichthyology*. 11: 94-99.
- Hempel, G. 1979. Early life history of marine fish. The egg stage. Washington Sea Grant Pub. 70 pp.
- Hernández López, A. 2003. Edad, crecimiento y reproducción de la sardina monterrey (*Sardinops caeruleus*) de Bahía Magdalena, B.C.S. durante 1981 a 1985. Tesis de licenciatura. UABCS. 65 pp.
- Hjort, J. 1914. Fluctuations in the great fisheries of northern Europe viewed in the light of biological research. *Cons. Perm. Int. Explor. Mar. Rapp. And Proc. Verb.* v. XX. 228 pp.
- Hossain, M.Y., Z.F. Ahmed, P.M. Leunda, S. Jasmine, J. Oscoz, R. Miranda y J. Ohtomi. 2006. Condition, length-weight and length-length relationships of the Asian striped catfish *Mystus vittatus* (Bloch, 1794) (Siluriformes: Bagridae) in the Mathabhanga River, southwestern Bangladesh. *Journal of Applied Ichthyology*. 22: 304-307.
- Houston, A. H. 1990. Blood and circulation. In *Methods for fish biology*. (Schreck, C.B. y P.B. Moyle, Editores). American Fisheries Society. pp. 273-334. Bethesda, Maryland.
- Houston, A. H. y A. Murad. 1992. Erythrocytometry in goldfish, *Carassius auratus* L.: temperature effects. *Physiological Zoology*. 65:55-76.
- Hunter, J. R. y R. Leong. 1981. The spawning energetics of female northern anchovy, *Engraulis mordax*. *Fish. Bull.* 79 (2): 215-229.
- Hunter, J. R. 1984. Feeding ecology and predation of marine fish larvae. In *Marine fish larvae. Morphology, ecology and relation of fisheries*. (Lasker, R. Editor). pp. 33-77. Washington.
- Hunter, J. R. y B. J. Macewicz. 1985. sexual maturity, batch fecundity, spawning frequency, and temporal pattern of spawning for the northern anchovy, *Engraulis mordax*, during the 1979 season. *CalCOFI*. 21: 139-149.
- Izquierdo, m.S., H. Fernández-Palacios y A.G.J Tacon. 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*. 197: 25-42.
- Jalabert, B., J-F. Baroiller, B. Breton, A. Fostier, F. Le Gac, Y. Guiguen y G. Monod. 2000. Main neuro-endocrine, endocrine and paracrine regulations of fish reproduction and vulnerability to xenobiotics. *Ecotoxicology*. 9: 25-40.

- Jalabert, B. 2005. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reprod. Nutr. Dev.* 45: 261-279.
- Kavadias, S., J. Castritsi-Catharios, A. Dessypris y H. Miliou. 2004. Seasonal variation in steroid hormones and blood parameters in cage-farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J. Appl. Ichthyol.*
- Kim, J.Y., S. Kim, Y.M. Choi y J.B. Lee. 2006. Evidence of density-dependent effects on population variation of Japanese sardine (*Sardinops melonosticta*) off Korea. *Fisheries Oceanography*. 15 (4): 345-349.
- King, H. R. y N.W. Pankhurst. 2003. Ovarian growth and plasma sex steroid and vitellogenin profiles during vitellogenesis in Tasmanian female Atlantic salmon (*Salmo salar*) *Aquaculture*. 219: 797–813.
- Kjesbu, O.S., J. Klungsøyr, H. Kryvi, P.R. Witthames y M. Greer Walker. 1991. Fecundity, atresia, and egg size of captive Atlantic cod (*Gadus morhua*) in relation to approximate body composition. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 2333-2343.
- Kjesbu, O.S., H. Kryvi y B. Norberg. 1996. Oocyte size and structure in relation to blood plasma steroid hormones in individually monitored, spawning Atlantic cod. *Journal of Fish Biology* 49: 1197-1215.
- Kokokiris, L., B. Mourot, F. Le Menn, M. Kentouri y A. Fostier. 2000. Endocrine changes during the annual reproductive cycle of the red porgy, *Pagrus pagrus* (Teleostei, Sparidae). *Fish Physiology and Biochemistry*. 23: 1-11.
- Kurita Y., S. Meier, O.S. Kjesbu. 2003. Oocyte growth and fecundity regulation by atresia of Atlantic herring (*Clupea harengus*) in relation to body condition throughout the maturation cycle. *Journal of Sea Research*. 49: 203– 219
- Lafauri M y R Pauli. 1972. Histologie de l'hypophyse de quelques téléostéens. *Bull. Inst. Oceanogr. Monaco*. Vol. 70, 31 pp.
- Lane, H.C. 1979. Progressive changes in haematology and tissue water of sexually mature trout, *Salmo gairdneri* Richardson during the autumn and winter. *Journal of Fish Biology*. 15: 425-436.
- Lethimonier, C. G. Flouriot, Y. Valataire, O. Kah y B. Ducouret. 2000. Transcriptional interference between glucocorticoid receptor and estradiol receptor mediates the inhibitory effect of cortisol on fish vitellogenesis. *Biology of Reproduction*. 62: 1763-1771.
- Linares-Casenave, J., K.J. Kroll, J.P. Van Eenennaam y S.I. Doroshov. 2003. Effect of ovarian stage on plasma vitellogenin and calcium in cultured white sturgeon. *Aquaculture*. 221: 645-656.
- Lluch-Belda, D., R.J.M. Crauford, T. Kawasaki, A.D. MacCall. R. H. Parrish, R.A. Schwartzlose y P.E. Smith. 1989. World-wide fluctuations of sardine and anchovy stocks: the regimen problem. *S. Afr. Mar. Sci.* 8: 195-205.

- Lluch-Belda, D., Lluch-Cota, D.B., Hernández-Vázquez, S., Salinas-Zavala, C.A. y R.A. Schwartzlose. 1991. Sardine and anchovy spawning as related to temperature and upwelling in the California Current System. CalCOFI rep. 32: 105-111.
- Lluch-Belda, D., R.A. Schwartzlose, R. Serra, R. H. Parrish, T. Kawasaki, D. Hedgecock y R.J.M. Crauford. 1992. Sardine and anchovy regime fluctuations of abundance in four regions of the world oceans: a workshop report. Fish. Oceanogr. 1(4): 339-347.
- Lutes, P. B.; Doroshov, S.I.; Chapman, F.; Harra, J.; Fitzgerald, R. y Fitzpatrick, M. 1987. Morpho-physiological predictors of ovulatory success in white sturgeon *Acipenser transmontanus* Richardson. Aquaculture. 66: 43-52.
- Lynn, R. J. 2003. Variability in the spawning habitat of Pacific sardine (*Sardinops sagax*) off southern and central California. Fisheries Oceanography. 12 (6): 541-553.
- Macewicz, B.J., J.J. Castro-González, C.E. Coto-Altamirano y J.R. Hunter. 1996. Adult reproductive parameter of Pacific sardine (*Sardinops sagax*) during 1994. CalCOFI. 37: 140-151.
- MacGregor, J. S. 1957. Fecundity of the Pacific sardine (*Sardinops caerulea*). Fishery Bulletin of the Fish and Wildlife Service. 121: 427-448.
- Maise, G. y B. Breton. 1996. Contrôle photopériodique de la saison de reproduction chez les salmonidés. INRA. Prod. Anim. 9 (1): 71-77.
- Marte, C.L. y Lam T.J.. 1992. Hormonal changes accompanying sexual maturation in captive milkfish (*Chanos chanos* Forsskal). Fish Physiology and Biochemistry. 10 (4): 267-275.
- Martoja, R. y Martoja P. 1970. Técnicas de histología animal. Toray-Masson. Barcelona. 350 pp.
- Matsubara T., S. Honda, T. Wada, K. Soyano y A. Hara. 1995. Seasonal changes in serum levels of vitellogenin and estradiol-17 $\beta$  related to sexual maturation in rearing female Japanese sardine *Sardinops melanostictus*. Bull. Hokkaido Natl. Fish. Res. Inst. 59:19-29.
- Matsuyama, M., Y. Nagahama y S. Matsura. 1991. Observations on ovarian follicle ultrastructure in the marine teleost, *Pagrus major*, during vitellogenesis and oocyte maturation. Aquaculture. 92: 67-82.
- Max M. y M. Menaker. 1992. Regulation of melatonin production by Light, darkness, and temperature in the trout pineal. J Comp Physiol A. 170: 479-489.
- Mayer, I., S. E. Sjakley y P. R. Witthames. 1988. Aspects of the reproductive biology of the sea bass *Dicentrarchus labrax* L. I. An histological and histochemical study of oocyte development. Journal of Fish Biology. 409: 313-324.

- Mayer I., M. Schmitz, B. Borg y R. Schulz. 1992. Seasonal endocrine changes in male and female Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). I. Plasma levels of three androgens, 17  $\beta$ -hydroxy-20  $\beta$ -dihydroxyprogesterone, and 17  $\beta$ -estradiol. *Can. J. Zool.* 70: 37-42.
- Mayer, I., C. Bornestaf y B. Borg. 1997. Melatonin in non-mammalian vertebrates. Physiological roll in reproduction? *Comp. Physiol. Biochem.* 118A, 515-531.
- Mazurais D., I. Brierly, I. Anglade, J. Drew, C. Randall, N. Bromage, D. Michel, O. Kah y L. M. Williams. 1999. Central melatonin receptor in the rainbow trout: comparative distribution of ligand binding and gene expression. *The Journal of Comparative Neurology.* 409: 313-324.
- Micale, V., G. Maricchiolo y I. Genovese. 2002. The reproductive biology of blackspot sea bream *Pagellus bogaraveo* in captivity. I. Gonadal development, maturation and hermafroditism. *Journal of Applied Ichthyology.* 18: 172-176.
- Motta, C.M., S. Tamaro, P. Simoniello, M. Prisco, L. Ricchiari, P. Andreuceti y S. Filosa. 2005. Characterization of cortical alveoli content in several species of Antarctic notothenioids. *Journal of Fish Biology.* 66: 442-453.
- Mousa, M.A. y S.A. Mousa. 2003. Immunohistochemical localization of inhibin and activin-like proteins in the brain, pituitary gland, and the ovary of thin-lipped grey mullet, *Liza ramada*. *Comparative Endocrinology.* 132 (3): 434-443.
- Munro, A.D. 1990. Reproductive seasonality in teleosts: enviromental influences. I. General Introduction. (Munro, A.D.; Scott, A.P. y Lam, T.J. Editores). pp. 2-11. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Murayama T, M Shiraishi y I Aoki. 1994. Changes in ovarian development and plasma levels of sex steroid hormones in the wild female Japanese sardine (*Sardinops melanostictus*) during the spawning period. *Journal of Fish Biology.* 45: 235-245.
- Nagahama, Y. 1983. The functional morphology in teleost gonads. *En Reproduction.. Endocrine tissues and hormones. Fish Physiology.* Edit. W.S. Hoar, D.J. Randall y E.M. Donaldson. Vol. IX A: 223-276.
- Nagahama, Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int. J. Dev. Biol.* 38: 217-229.
- Nespolo, R.F. y M. Rosenmann. 2002. Intraespecific allometry of haematological parameters in *Basilichthys australis*. *Journal of Fish Biology.* 60: 1358-1362.
- Newman, D.M., P.L. Jones y B.A. Ingram. 2007. Temporal dynamics of oocyte development, plasma sex steroids and somatic energy reserves during seasonal ovarian maturation in captive Murria cod *Maccullochella peelii pelii*. *Comparative Biochemistry and Physiology A.* 148: 876-887.
- Nikolsky, G. V. 1963. The ecology of fishes. Academic Press, New York.

- Ocampo-Cervantes, J. A. 2002. Desarrollo gonádico y actividad reproductiva de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Teleostei: Serranidae) en la Bahía de la Paz, Baja California Sur. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. 78 pp.
- Ochoa-Baéz, R. I. 1998. Estacionalidad reproductiva y producción ovárica de la anchoa europea, *Engraulis encrasicolus* (Clupeiformes: Engraulidae) en el mar Catalán. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Cataluña, Barcelona. 232 pp.
- Olim, S. y T.C. Borges. 2006. Weight-length relationships for eight species of the family Triglidae discarded on the south coast of Portugal. *Journal of Applied Ichthyology*. 22: 257-259.
- Parrish, R.H. y D. L. Mallicoate. 1995. Variation in the condition factors of California pelagic fishes and associated environmental factors. *Fisheries Oceanography*. 4, 2: 171-190.
- Patiño, R. y C.V Sullivan. 2002. Ovarian Follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry*. 26: 57-70.
- Patterson, k.R. 1992. An improved method for studying the condition of fish, with an example using Pacific sardine *Sardinops sagax* (Jenyns). *Journal of Fish Biology*. 40: 821-831.
- Persson, P., K. Sundell, B. Th. Björsson y H. Lundqvist. 1998. Calcium metabolism and osmoregulation during sexual maturation of river running Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*. 52: 334-349.
- Peter R E. 1983. The brain and neurohormones in teleost reproduction. *En* Reproduction. Endocrine tissues and hormones. Fish Physiology. W.S. Hoar, D.J. Randall y E.M. Donaldson Eds. Vol. IX A: 97-136.
- Planas, J.V., J. Athos, F. W. Goetz y P. Swanson. 2000. Regulation of ovarian steroidogenesis in vitro by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during sexual maturation in Salmonid fish. *Biology of Reproduction*. 62: 1262–1269.
- Porter M J R, N Duncan, S O Handeland, S O Stefansson y N R Bromage. 2001. Temperature, light intensity and plasma melatonin levels in juvenile Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*. 58: 431-438.
- Pottinger, T.G. y A.D. Pickering. 1987. Androgen levels and erythrocytosis in maturing brown trout, *Salmo trutta* L. *Fish Physiology*. 3, 3: 121-126.
- Prat, F.; M. Carrillo; S. Zanuy y A. Fostier. 1985. Fluctuations of plasma levels of testosterona and 11-ketotestosterone in males and 17 $\beta$  estradiol in females of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) along the year. *Fish Culture Abstracts* A1.16. European Society for Comparative Physiology and Biochemistry. Barcelona.
- Prat, F., S. Zanuy, M. Carrillo, A. De Mones y A. Fostier. 1990. Seasonal changes in plasma levels of gonadal steroids of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *General and Comparative Endocrinology*. 78: 361-373.

- Rideout, R.M., D.M. Maddock and M.P.M. Burton. 1999. Oogenesis and the spawning pattern in Greenland halibut from the North-west Atlantic. *Journal of Fish Biology* 54: 196-207.
- Rideout, R.M., M.P.M. Burton y G.A. Rose. 2000. Observations on mass atresia and skipped spawning in northern Atlantic cod, from Smith Sound, Newfoundland. *Journal of Fish Biology*. 57: 1429-1440.
- Rideout, R.M., G.A. Rose y M.P.M. Burton. 2005. Skipped spawning in female iteroparous fishes. *Fish and Fisheries*. 6: 50-72.
- Rinchar, J. P. Kestemont y R. Heine. 1997. Comparative study of reproductive biology in single and multipla-spawner cyprinid fish. II. Sex steroid and plasma protein phosphorus concentrations. *Journal of Fish Biology*. 50: 169-180.
- Rios, F.S., A.L. Kalinin y f.T. Rantin. 2002. The effects of long-term food deprivation on respiration and haematology of the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Journal of Fish Biology*. 61: 85-95.
- Robinson, C.J., S. Gómez-Aguirre y J. Gómez-Gutiérrez. 2007. Pacific sardine behaviour related to tidal current dynamics in Bahía Magdalena, México. *Journal of Fish Biology*. 71: 200-218.
- Rodríguez Gutiérrez, M. 1992. Técnicas de evaluación cuantitativa de la madurez gonádica en peces. AGT Eds. México. 79 pp.
- Rodríguez, L.; I. Begtashi, S. Zanuy, M. Shaw, M. Carrillo. 2001. Changes in plasma levels of reproductive hormones during first sexual maturation in European male sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) under artificial day lengths. *Aquaculture*. 202: 235-248.
- Rough, K.M., B.F. Nowak y R.E. Reuters. 2005. Haematology and leucocyte morphology of wild caught *Thunnus maccoyii*. *Journal of Fish Biology*. 66: 1649-1659.
- Šantić, M., A. Pollaoro e I. Jardas. 2006. Co-variation of gonadosomatic index and parameters of length.weight relationships of Mediterranean horse mackerel, *Trachurus mediterraneus* (Steindachner, 1868) in the eastern Adriatic sea. *Journal of Applied Ichthyology*. 22: 214-217.
- Schulz, R.W.; van der Corput, L.; Janssen-Dommerholt, J. y Goos, H.J.Th. 1994. Sexual steroids during puberty in male african catfish (*Clarias gariepinus*): serum levels and gonadotropin-stimulated testicular secretion in vitro. *J. Comp. Physiol. B*. 164: 195-205.
- Scout, A.P., P.R. Witthames, R.J. Turner y A.V.m. Canario. 1998. Plasma concentrations of ovarian steroids in relation to oocyte final maturation and ovulation in female plaice sampled at sea. *Journal of Fish Biology*. 52: 128-145.
- Sherburne, S.W. 1973. Differential blood cells counts of Atlantic herring, *Clupea harengus*. *Fishery Bulletin*. 71 (4): 1011-1017.

- Shigdar, S., D. Cook, P. Jones, A. Harford y A.C. Wards. 2007. Blood cells of Murray cod *Maccullochella peelii peelii* (Mitchell). *Journal of Fish Biology*. 70: 973-980.
- Sinovčić, G. 2006. Growth and length-weight relationship of the juvenile anchovy, *Engraulis encrasicolus*, in the nursery ground (Zrmanja River estuary-eastern Adriatic Sea). *Journal of Applied Ichthyology*. 20: 79-89.
- Sullivan, C.V. 2003. Hormonal control of teleost reproduction. Curso de reproducción en peces. 17 al 21 de noviembre. Cuernavaca, Morelos. 34-37.
- Summerfelt, R.C. y Smith, L.S. 1990. Anesthesia, surgery, and related techniques. In *Methods for fish biology*. (Schreck, C.B. y P.B. Moyle, Editores). American Fisheries Society. pp. 213-272. Bethesda, Maryland.
- Sumpter, J.P. 1990. Reproductive seasonality in teleosts: environmental influences. I. General Introduction. (Munro, A.D.; Scott, A.P. y Lam, T.J. Editores). pp. 13-32. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Sumpter, J.P. 1997. Environmental control of fish reproduction: a different perspective. *Fish Physiology and Biochemistry*. 17: 25-31.
- Sund, B. y N.W. Pankhurst. 2004. Patterns of oocyte growth, vitellogenin and gonadal steroid concentrations in greenback flounder. *Journal of Fish Biology*. 64: 1399-1412.
- Suquet, M., Y. Normant, J.L. Gaignon, L. Quémener y C. Fauvel. 2005. Effect of water temperature on individual reproductive activity of pollack (*Pollachius pollachius*). *Aquaculture*. 243: 113-120.
- Tavares-Dias, M. 2006 a. Cytochemical method for staining fish basophils. *Journal of Fish Biology*. 69: 312-317.
- Tavares-Dias, M. 2006 B. A morphological and cytochemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts. *Journal of Fish Biology*. 68: 1822-1833.
- Tavares-Dias, M. y F.R. Moraes. 2007. Haematological and biochemical reference intervals for farmed channel catfish. *Journal of Fish Biology*. 71:383-388.
- Tomkiewicz, J., L. Tybjerg y Å. Jespersen. 2003. Micro-and macroscopic characteristics to stage gonadal maturation of female Baltic cod. *Journal of Fish Biology*. 62: 253-275.
- Torres-Villegas, J. R. 1986. Evaluación de *Sardinops sagax* por el método de producción de huevos, en Bahía Magdalena, B.C.S., México. Tesis de MC. CICIMAR-IPN. La Paz, B.C.S., México. 116 pp
- Torres-Villegas, J.R., R.I. Ochoa-Baéz,, L. Perezgómez-Alvarez, y G. García-Melgar. 1995a. Comparison of seasonal variability in reproduction of Pacific sardine

(*Sardinops sagax*) from Baja California Sur, Mexico, in years 1982-1992. *Scientia Marina*. 59 (2-3): 255-264.

- Torres-Villegas, J.R., R.I. Ochoa-Baéz y M.S. Muletón-Gómez. 1995b. Temperatura effect on spawning and structure of eggs of *Sardinops sagax*, Clupeidae, during five circadian cycles in Bahía Magdalena, Baja California Sur, Mexico. *Scientia Marina*. 59 (3-4): 439-443.
- Torres-Villegas, J.R. 1997. La reproducción de la sardina monterrey *Sardinops caeruleus* (Girard, 1854) en el Noroeste de México y su relación con el ambiente. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Cataluña, Barcelona, España. 296 pp.
- Torres-Villegas, J.R.; R.I. Ochoa-Baéz, y G. García-Melgar. 2002. Programa de muestreadores a bordo. CICIMAR-IPN. 40 pp.
- Torres-Villegas, J.R., R.I. Ochoa-Baéz, L. Perezgómez y G. García-Melgar. 2007. Estimaciones de atresia mayor en la temporada reproductiva de 199-2000 en la sardina monterrey (*Sardinops sagax*) en Bahía Magdalena, México. *Rev. De Biol. Mar. Y Oceanografía*. 42 (3): 299-310.
- Trippel, E.A. y H.H. Harvey. 1990. ovarian atresia and sex ratio imbalance in white sucker, *Catostomus commersoni*. *Journal of Fish Biology*. 36: 231-239.
- Tyler, C.R. y J.P. Sumpter. 1996. Oocyte growth and development in the teleosts. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 6: 287-318.
- van Oordt, P.G.W.J. y J. Peute. 1983. The cellular origin of pituitary gonadotropins in teleosts. *En Reproduction.. Endocrine tissues and hormones*. Fish Physiology. Edit. W.S. Hoar, D.J. Randall y E.M. Donaldson. Vol. IX A: 137-186.
- von Bertalanffy, L. 1950. The theory of open systems in physics and biology. *Science*. 111: 23-29.
- Wallace, R. A. y K. Selman. 1981. Cellular and dynamics aspects of oocyte growth in teleosts. *Amer. Zool.* 21: 325-343.
- Weber, G.M.; King, V.W.; Clark, R.W.; Hodson, R.G. y Sullivan, C.V. 2000. Morpho-physiological predictors of ovulatory success in captive striped bass (*Morone saxatilis*). *Aquaculture*. 188: 133-146.
- Webster, D. y M. Webster. 1974. Comparative vertebrate morphology. Academic Press. London. 517 pp.
- Yatsu, A., T. Watanabe, M. Ishida, H. Sugisaki y L.D. Jacobson. 2005. Environmental effects on recruitment and productivity of Japanese sardine *Sardinops melanostictus* and chub mackerel *Scomber japonicus* with recommendations for management. *Fish. Oceanog.* 14(4): 263-278.

- Zanuy, S. y M. Carrillo. 1987. La reproducción de los teleósteos y su aplicación en la acuicultura. pp. 1-131. En: Reproducción en acuicultura (J. Espinosa de los Monteros y U. Labarta, Eds.). Plan de Formación de Técnicos en Acuicultura, Programa Especial de I+D de Acuicultura CAICYT, Madrid, España.
- Zanuy, S. y M. Carrillo. 1993. Técnicas de control de la reproducción en los teleósteos. En: Acuicultura (F. Castelló, coord.) pp. 143-156. Pub. Univ. Barna. Barcelona. España.
- Zanuy, S, M. Carrillo, A. Felip, L. Rodríguez, M. Blázquez, J. Ramos y F. Piferrer. 2001. Genetic, hormonal and environmental approaches for the control of reproduction in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*. 202: 187-203.
- Zorica, B., G. Sinovčić, A. Pallaoro y V. Čikeš Keč. 2006. Reproductive biology and length-weight relationship of painted comber *Serranus scriba* (Linnaeus, 1758), in the Trogir Bay area (middle-eastern Adriatic). *Journal of Applied Ichthyology*. 22: 260-263.
- Zohar, Y y C. C. Mylonas. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*. 197: 99-136.