

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN
SUPERIOR DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN ACUICULTURA**

**MADURACIÓN GONADAL E INDUCCIÓN AL DESOVE DE LA SARDINA
DEL PACÍFICO *Sardinops sagax caeruleus***

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

MARISOL SIMÓN DÍAZ

Ensenada, Baja California, México, Septiembre del 2009.

RESUMEN de la tesis de **Marisol Simón Díaz**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS con orientación en Acuicultura. Ensenada, Baja California, México. Septiembre del 2009.

MADURACIÓN GONADAL E INDUCCIÓN AL DESOVE DE LA SARDINA DEL PACÍFICO *Sardinops sagax caeruleus*

Resumen aprobado por:

Dr. Benjamín Barón Sevilla

En los peces teleósteos, la hormona análoga liberadora de gonadotropinas (GnRHa) frecuentemente se utiliza para estimular el desarrollo gonadal, así como para inducir la maduración final de los ovocitos, la ovulación, espermiación y el desove. Con el objetivo de obtener huevos fértiles de la Sardina del Pacífico *Sardinops sagax caeruleus*, se estudiaron las gónadas de ésta especie y se definió una escala de madurez sexual adecuada para identificar el momento idóneo para inducir el desove y para evaluar el estado de las sardinas antes y después de la inducción. La clasificación comprendió los estadios: Inmaduro (I), ovocitos perinucleolares con diámetros < 200 μ ; En Maduración (II), ovocitos previtelogénicos con diámetros de 220 a 669 μ ; Maduro (III), ovocitos vitelogénicos con diámetros > 700 μ ; y En Reabsorción (IV), ovocitos atrésicos con diámetro promedio de 200 μ . Para estudiar el efecto de la hormona liberadora de gonadotropinas análoga (GnRHa), un grupo de sardinas capturadas en la costa del municipio de Ensenada fueron acondicionadas para la reproducción, primero con un régimen natural de fotoperiodo y temperatura (Junio-07 a Marzo-08) y después con un régimen controlado (Julio-08 a Octubre-08), en un sistema de recirculación, en el laboratorio de Acuicultura del CICESE. Para la inducción al desove con GnRHa se emplearon dos concentraciones (25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal dividido en dos dosis para el primer régimen y 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal para el segundo régimen) y un grupo control sin inyección. Los organismos fueron anestesiados con tricaina (40 mg l⁻¹), inyectados intraperitonealmente y colocados en estanques de desove de 272 l. Después de un periodo de 96 h, no se registró el desove, por lo que todos los organismos se sacrificaron y al diseccionarlos se observó que las gónadas aun se encontraban en proceso de maduración. El análisis histológico mostró que los ovarios de los organismos expuestos al régimen natural contenían ovocitos en todos los estadios de desarrollo y en aquellos expuestos a la GnRHa se observó un mayor número de ovocitos

atrésicos, posiblemente a causa del estado inicial de maduración. Los organismos expuestos al régimen artificial y estimulados con GnRHa no desovaron, pero en el 95 % de las hembras analizadas se observó el proceso de maduración final, que se evidenció por la migración de la vesícula germinal. Para explicar el efecto de la GnRHa sobre las hormonas esteroideas que regulan la gametogénesis se realizó un análisis de la concentración de estradiol (E_2), 11-ketotestosterona (11KT) y de los esteroideos inductores de la maduración final, $17,20\beta$ -P y $17,20\beta,21$ -P. Las concentraciones de los esteroideos estudiados fueron menores que los niveles basales (menor a 1 ng/ml) excepto el $17,20\beta,21$ -P (concentraciones plasmáticas > a 1 ng/ml), es posible que este esteroide controle la maduración final en la sardina del Pacífico. Las bajas concentraciones de los esteroideos pueden estar relacionadas con el estrés al que se sometieron estos organismos.

Palabras Clave: Maduración gonadal, GnRHa, Ovocito, Fotoperiodo, Temperatura.

Abstract from the thesis of **Marisol Simón Díaz**, presented as a partial requirement for obtaining the Masters degree in Sciences with orientation in Aquaculture. Ensenada, Baja California. September 2009.

GONADAL MATURATION AND SPAWNING INDUCTION OF THE PACIFIC SARDINE *Sardinops sagax caeruleus*

In teleosts fish, analogs of gonadotropin releasing hormone (GnRH α) are frequently used to stimulate the gonadal development as well as to induce the final oocytes maturation, ovulation, spermiation and spawning. With the objective of obtaining fertile eggs from the Pacific Sardine, *Sardinops sagax caeruleus*, the gonads of this specie were studied and an adequate scale of sexual maturity was defined to identify the suitable moment to induce the spawning and to evaluate the sardine condition before and after the induction. The classification was conformed by four states: Immature (I), perinuclear oocytes with diameters < 200 μ ; In maturation (II), previtelogenic oocytes with diameters between 220 μ and 669 μ ; Mature (III), vitellogenic oocytes with diameters > 700 μ ; and in reabsorption (IV), atretic oocytes with an average diameter of 200 μ . To study the agonist effect of gonadotropin-releasing hormone (GnRH α), a group of sardines captured in the coast of the Ensenada municipality were conditioned for reproduction, first with a natural regimen of photoperiod and temperature (June-07 to March-08) and then with a controlled regimen (July-08 to October-08), in a recirculation system at CICESE aquaculture laboratory. For the spawning induction with the GnRH α two concentrations were used (25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of body weight divided in two doses for the first regimen and 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of body weight for the second one) and a control group without injection. The organisms were anesthetized with tricaine (40mg l $^{-1}$), intraperitoneally injected and placed in spawning ponds of 272 l. After a 96h period, the fish did not spawn. Then, all organisms were dissected and it could be observed that the gonads were yet in maturation process. The histological analysis showed that the ovaries from organisms exposed to natural regimen contained oocytes in all development states, and a major number of atretic oocytes was observed in those that were exposed to the GnRH α , probably because of the initial state of maturation. The organisms exposed to the artificial regimen, stimulated with GnRH α , did not spawn. However, the final maturation process was observed in the 95% of the analyzed females. This process was evidenced by the germinal vesicle migration. Different analysis were performed to explain the GnRH α effect over steroids hormones that regulate the gametogenesis, estradiol (E2), 11- ketotestosterone (11KT) and maturation inductor steroids (17,20 β ,21-P). The concentrations from the

studied steroids were less than the basal levels (less than 1ng/ml) except from the 17, 20 β , 21-P (plasmatic concentrations > 1ng/ml). It is possible that this steroid controls the final maturation of the Pacific sardine. Low steroid concentrations can be related with the stress that these organisms were submitted.

Key words: Gonadal Maturation, GnRH α , Oocyte, Photoperiod, Temperature.

Doy gracias a la vida por ayudarme a lograr esta meta, por la maravillosa familia que me ha dado, sin la cual no habría podido alcanzar mis sueños.

Gracias a mi madre, gran mujer, la mejor y a mi pai, por su ejemplo y apoyo en todo momento....siempre.

A mis hermanos y sus esposas, a mis sobrinos... los amo.

Mario eternamente somos uno.

Gracias a mi profesor guía y a su familia, por su paciencia infinita.

A mis amigas las de siempre... Dolls house

Este es mi arte...Selassie

Agradecimientos...

Dr. Benjamín Barón Sevilla, por aceptarme en su equipo, dirigir este trabajo, confianza y apoyo infinito... Gracias!!!

Dr. Adelino V. M. Canario tutor de la parte experimental "cuantificación de esteroides sexuales en el plasma de la sardina del Pacífico". Gracias por la confianza y todas las facilidades.

Dra. Mónica Hernández Rodríguez, Miembro de Comité tutorial de tesis. Gracias por la paciencia y asesorías durante todo este tiempo.

M.C Vicente Ferreira Bartrina, Miembro del comité tutorial de tesis, por el apoyo, paciencia y sugerencias aportadas a mi formación académica.

H. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca escolar y beca mixta para la realización de una estancia de investigación.

Proyecto fondo sectorial SEMARNAT-CONACYT, clave, 23658. La Ecofisiología de los peces pelágicos de importancia económica, una herramienta para predecir los efectos del cambio climático, por el apoyo económico para la realización de este trabajo.

Proyecto interno OOF038. Control de la reproducción de peces marinos, por el apoyo económico para la realización de este trabajo.

Elsa Couto, por el apoyo durante mi estancia, análisis de esteroides, entrenamiento, el uso de su información y sobre todo, su sincera amistad. Elsa muito obrigada.

Miembros del Laboratorio de Endocrinología Comparada y Molecular del CCMAR de la universidad de Algarve, campus Gambelas, Faro, Portugal. Técnico,

Miembros del Laboratorio de Reproducción de peces marinos por todas las facilidades.

Laboratorio de Patología y al Dr. Jorge Cáceres del CICESE por las facilidades.

M. C. Yanet Guerrero Rentarías por el entrenamiento y apoyo en la elaboración de las láminas histológicas y gran amistad.

M.C. Carmen Rodríguez Jaramillo por el entrenamiento y manejo del programa de computo Sigmascan.

Oceanóloga Cristina Sánchez, por la determinación de la edad de las sardinas.

Técnico Francisco Valenzuela por su colaboración en la realización de los dibujos para esta tesis.

DR. Juan Pablo Lazo y Dra. Beatriz Cordero, por su apoyo para la realización de mi estancia académica.

Dr. Luis Fernando Buckle, Dra. Pilar Sánchez, Dra. Rosa Mourño, Dr. Alexei Fedorovich Licea, Dr. Eugenio Díaz, Dr. Miguel Ángel Portilla y Dra. Carmen Paniagua, por todo su apoyo y asesorías.

Dr. Manuel Segovia Quintero, por su colaboración a este trabajo y apoyo continuo.

M. C. Marcel Martines Porchas por su colaboración en este estudio y su sincera amistad.

A la Dirección de Servicios Escolares: Dolores Sarracino, Ivonne Best, Norma A. Fuentes y Ciclali Romero por el apoyo constante.

Técnicos Adrián Celaya y José G. Espinoza por su apoyo con los sistemas de recirculación de las sardinas. A las secretarías del departamento de Acuicultura, Varuni, Bibiana, Adriana y Cecilia por su amabilidad y apoyo.

M.C. Verónica Vizcaíno y M.C. Julio Sánchez-Aldana por su sincera y cálida amistad.

M. C. Socorro Jiménez por su apoyo, sugerencias durante esta etapa y gran amiga.

Alexander Castillo... por tu apoyo en todo momento.

A mis amigos de generación: Getsemany Juárez, Catalina Chávez, Ana Bastos, Haydee Lara, Paola Pérez, Diana López, Emmanuel Martínez, Fernando García, Luis Márquez, Iván Monay y Marco Anzuetto, por todas las experiencias, el cariño y el folklore.

A todos aquellos que de una u otra manera me dieron su apoyo.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	i
ABSTRACT	iii
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
CONTENIDO	viii
Lista de Figuras	x
Lista de Tablas	xvi
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Fisiología del desarrollo gonadal	5
I.2. Reproducción y talla de primera madurez	7
II. ANTECEDENTES	8
III. OBJETIVOS	14
III.1. Hipótesis	14
III.2. Objetivo General	14
III.2.1. Objetivos particulares	14
IV. METODOLOGÍA	15
IV.1. Maduración gonadal	15
IV.1.1. Análisis macro y microscópico	15
IV.1.2. Análisis histológico	16
IV.1.3. Determinación del diámetro teórico	16
IV.2. Maduración de <i>S. sagax caeruleus</i> con régimen natural de fotoperiodo y temperatura	17
IV.2.1. Acondicionamiento de los organismos	17
IV.2.1.1. Parámetros Físicoquímicos	17
IV.2.1.2. Factor de condición	18
IV.2.1.3. Índice gonadosomático	18
IV.2.2. Diagnóstico de la madurez gonadal	18
IV.2.3. Inducción al desove con GnRHa	19
IV.3. Maduración de <i>S. sagax caeruleus</i> bajo un régimen artificial de fotoperiodo y temperatura	20
IV.3.1. Acondicionamiento de los organismos	20
IV.3.2. Diagnóstico de la maduración	23
IV.3.3. Inducción al desove con GnRHa	23
IV.3.4. Cuantificación de esteroides sexuales en plasma de <i>S. sagax caeruleus</i>	24
IV.3.4.1. Obtención del plasma	24
IV.3.4.2. Radioinmunoensayo	25
IV.3.4.3. Anticuerpos y Marcadores	25

IV.3.4.4. Extracción y cromatografía	25
IV.4. Análisis estadístico	26
V. RESULTADOS.....	27
V.1. Maduración gonadal	27
V.1.1. Análisis macro y microscópico	27
V.2. Maduración de <i>S. sagax caeruleus</i> con régimen natural de fotoperiodo y temperatura	44
V.2.1. Acondicionamiento de los organismos	44
V.2.1.1. Parámetros fisicoquímicos	44
V.2.1.2. Factor de condición	46
V.2.1.2. Índice gonadosomático	47
V.2.2. Diagnóstico de la madurez gonadal	48
V.2.3. Inducción hormonal con GnRH α	51
V.3. Maduración de <i>S. sagax caeruleus</i> bajo un régimen artificial de fotoperiodo y temperatura	56
V.3.1. Acondicionamiento de los organismos	56
V.3.1.1. Parámetros fisicoquímicos	56
V.3.2. Diagnostico de la maduración gonadal	57
V.3.3. Inducción hormonal con GnRH α	63
V.3.4. Cuantificación de esteroides sexuales en el plasma de la sardina del Pacífico	68
VI. DISCUSIÓN.....	79
VI.1. Maduración gonadal	79
VI.2. Acondicionamiento reproductivo en un régimen natural de fotoperiodo y temperatura e inducción al desove con GnRH α	82
VI.3. Inducción hormonal con la GnRH α bajo un régimen artificial de fotoperiodo y temperatura	87
VI.3.1. Cuantificación de esteroides	89
VII. CONCLUSIONES.....	94
VIII. RECOMENDACIONES.....	95
IX. LITERATURA CITADA.....	96
X. ANEXO.....	105

Lista de Figuras		
Figura		Página
1	Diagrama del sistema experimental de recirculación, en condiciones controladas de luz y temperatura, A: Tanque, B: Motobomba, C: Biofiltro, D: Bomba de calor, E: Aireación y F: Luz.	21
2	Acondicionamiento reproductivo de <i>S. sagax caeruleus</i> bajo un régimen artificial de fotoperiodo y temperatura. Las barras horizontales representan el momento del muestreo del diagnóstico de madurez gonadal.	22
3	Fotografía histológica que muestra el desarrollo gonadal en las hembras de la sardina del Pacífico <i>S. sagax caeruleus</i> . 200X. Fijador Bouin. Tinción H&E. Vg: Vesícula germinal, Pn: Ovocito perinucleolar, Pv: Ovocito previtelogénico, AC: etapa Alvéolo cortical, comienza la endovitelogénesis, V: Ovocito vitelado, OA: Ovocito atrésico y FO: Folículo Ovárico.	30
4	Fotografía histológica de un testículo de la sardina del Pacífico <i>S. sagax caeruleus</i> en maduración. 400X. Fijador Davison, Tinción H&E. Lo: Lóbulo, Lu: Lumen, Es: Espermatogonias, Ep: Espermatoцитos primarios y secundarios (se tiñen de un color rosa), Et: Espermátidas y E: Espermatozoides (se tiñen de color morado-azul).	31
5	Fotografías que muestran el desarrollo gonadal a nivel macroscópico de la sardina del Pacífico <i>Sardinops sagax caeruleus</i> . G: Gónada, vs: vaso sanguíneo.	35
6	Esquemas de la longitud que ocupa la gónada con relación a la longitud total de la cavidad abdominal del mismo de la sardina del Pacífico <i>sardinops sagax caeruleus</i> . Dibujo por Francisco Valenzuela Buriel.	36

Figura	Lista de Figuras (continuación)	Página
7	Microfotografías que muestran el desarrollo ovárico de la sardina del Pacífico <i>Sardinops sagax caeruleus</i> . A. Estadio I. Inmadura, ovocitos previtelogénicos. B. Estadio II. En maduración, ovocitos en etapa de alveolo cortical. C y C1. Estadio III. Madura, ovocitos vitelogénicos. Foto D. Estadio IV. En Reabsorción, ovocitos atrésicos y, D1. Contraste de fases, células fagocíticas, OA _i = reabsorción celular inicial y OA _f = reabsorción celular final. L: Lámelas, VG: Vesícula Germinal, n: nucléolo, Pn: Ovocito perinucleolar, Pv: Ovocito previtelogénico. AC: Alvéolo Cortical, V: Ovocito vitelado y OA: ovocito atresico.	40
8	Microfotografías que muestran el desarrollo testicular de la sardina del Pacífico <i>Sardinops sagax caeruleus</i> . A. Estadio I Inmaduro, se caracteriza por la abundancia de espermatogonias y espermatocitos. B. Estadio II En maduración, se observan espermátides. C. Estadio III Maduro, espermatozoides en el lumen formando oleadas, no se observan lóbulos definidos. Foto D. IV En Reabsorción, Lu: Lumen, ei: espacio intersticial, Es: Espermatogonias, Ep: Espermatocitos, Et: espermátides, E: Espermatozoides, R: Reabsorción y f: células fagocíticas.	43
9	Promedio mensual de la variación de la temperatura registrada durante el periodo de acondicionamiento reproductivo de la sardina del Pacífico <i>Sardinops sagax caeruleus</i> , con un régimen natural del ambiente. La barra horizontal muestra el grado de madurez máximo que presentaban los organismos con relación a la temperatura y al momento en que se realizó el diagnóstico de la madurez. I= inmaduros; EM= en maduración y M= maduro, TATA= Temperatura del Agua del Tanque de Acondicionamiento.	45

Figura	Lista de Figuras (continuación)	Página
10	Factor de condición de la sardina del Pacífico, <i>Sardinops sagax caeruleus</i> en los cinco muestreos realizados durante en el periodo Junio-Agosto de 2007. La línea horizontal dentro de las cajas representa la mediana, los límites superior e inferior incluyen el 50% de los datos, las cotas superior e inferior el 95% de los datos y los círculos negros los valores extremos.	46
11	Índice gonadosomático de la sardina del Pacífico, <i>Sardinops s. caeruleus</i> , medido durante el periodo de acondicionamiento reproductivo. La línea horizontal dentro de las cajas representa la mediana, los límites superior e inferior incluyen el 50% de los datos, las cotas superior e inferior el 95% de los datos y los círculos negros los valores extremos.	47
12	Frecuencia relativa promedio de los diámetros de los ovocitos de la sardina del Pacífico, <i>Sardinops sagax caeruleus</i> , durante los meses de Diciembre del 2007 a Marzo del 2008.	50
13	Factor de condición de la sardina del Pacífico, <i>Sardinops sagax caeruleus</i> , calculado antes de la inducción al desove. Las letras iguales arriba de la barra indican que no existen diferencia significativa entre los tratamientos ($X^2 = 8.00$, $P > 0.05$). La línea horizontal dentro de las cajas representa la mediana, los límites superior e inferior incluyen el 50% de los datos, las cotas superior e inferior el 95% de los datos y los círculos negros los valores extremos.	53
14	Distribución de frecuencias del diámetro de los ovocitos de la sardina del Pacífico, <i>Sardinops sagax caeruleus</i> expuesta a diferentes dosis de GnRH α .	54
15	Promedio del porcentaje de folículos atrésicos en los ovarios de la sardina del Pacífico, <i>Sardinops sagax caeruleus</i> observados después de la inducción con GnRH α . Las letras iguales arriba de la barra indican que no hay diferencia significativa ($P > 0.05$, $F = 3.0$).	55

Figura	Lista de Figuras (continuación)	Página
16	Distribución de frecuencias de los diámetros de los ovocitos de la sardina del Pacífico, <i>Sardinops sagax caeruleus</i> , en muestreos consecutivos durante el proceso de acondicionamiento reproductivo con control de fotoperiodo y temperatura.	60
17	Microfotografías A. Ovocitos en maduración: 300-500 μm . 100X. B. Ovocitos en vitelogénesis tardía: 600-700 μm . 200X. ZR: Zona Radiata, FO: Folículo Ovárico, VG: Vesícula Germinal y gv: gránulos de vitelo.	61
18	Factor de condición de la sardina del Pacífico, <i>Sardinops sagax caeruleus</i> en muestreos consecutivos durante el proceso de acondicionamiento reproductivo con control de fotoperiodo y temperatura. La línea horizontal dentro de las cajas representa la mediana, los límites superior e inferior incluyen el 50% de los datos, las cotas superior e inferior el 95% de los datos y los círculos negros los valores extremos.	62
19	Índice Gonadosomático de la sardina del Pacífico <i>Sardinops sagax caeruleus</i> en muestreos consecutivos durante el proceso de acondicionamiento reproductivo con control de fotoperiodo y temperatura.	62
20	Evolución del índice Gonadosomático de las hembras de la sardina del Pacífico, <i>Sardinops sagax caeruleus</i> , después de la inducción al desove con una dosis de 20 μg de GnRH α kg^{-1} .	64
21	Evolución del índice Gonadosomático de los machos de la sardina del Pacífico, <i>Sardinops sagax caeruleus</i> , después de la inducción al desove con una dosis de 20 μg de GnRH α kg^{-1} .	64

Figura	Lista de Figuras (continuación)	Página
22	Ovocito maduro con un diámetro de 800 μm , se observan los gránulos de vitelo (V) en el proceso de coalescencia y numerosas gotas de aceite (gl) 400X. Fijador Davison. Tinción H&E.	66
23	Distribución de frecuencias de los diámetros de los ovocitos de la sardina del Pacífico, <i>Sardinops sagax caeruleus</i> , en muestreos consecutivos posteriores a la inducción con una dosis de 20 μg de GnRH α kg^{-1} .	67
24	Curvas estándar promedio para las fracciones libres de los esteroides 17,20 β -P, 11-KT y E $_2$ cuantificados por la técnica de radioinmunoensayo (n=2).	70
25	Concentración de los esteroides libres extraídos del plasma de la sardina del Pacífico, <i>Sardinops sagax caeruleus</i> . Las barras indican la concentración del esteroide en cada fracción eluída del cromatograma en capa fina (TLC) y medida por el método de radioinmunoensayo. Las barras de color blanco muestran la posición en que se eluyó el control positivo para cada hormona.	72
26	Niveles plasmáticos del esteroide inductor de la maduración final (17,20 β -P) de la sardina del Pacífico, <i>Sardinops sagax caerulea</i> , después de la inducción al desove con la hormona GnRH α . La línea punteada indica la concentración basal del esteroide. La línea vertical indica la desviación estándar.	74
27	Niveles plasmáticos promedio del esteroide inductor de la maduración final (17,20 β ,21-P) en la sardina del Pacífico, <i>Sardinops sagax caeruleus</i> , después de la inducción al desove con la hormona GnRH α . La línea punteada indica la concentración basal del esteroide. Las líneas verticales indican la desviación estándar.	76

Figura	Lista de Figuras (continuación)	Página
28	Niveles plasmáticos de estradiol (E ₂) de la sardina del Pacífico, <i>Sardinops sagax caerulea</i> , después de la inducción al desove con la hormona GnRH _a . La línea punteada indica la concentración basal del esteroide. Las líneas verticales indican la desviación estándar.	77
29	Niveles plasmáticos de 11-Ketotestosterona (11-KT) en los machos después de la inducción al desove con la hormona GnRH _a de la sardina del Pacífico. La línea punteada indica la concentración basal del esteroide. Las líneas verticales indican la desviación estándar.	78

Lista de Tablas		
Tabla		Página
I	Protocolo para la primera administración de GnRHa.	19
II	Protocolo para la segunda administración de GnRHa.	24
III	Escala de maduración gonadal para las hembras de la sardina del Pacífico que se distribuye en la costa oeste de Baja California.	32
IV	Escala de maduración gonadal para los machos de la sardina del Pacífico que se distribuye en la costa oeste de Baja California.	34
V	Peso y longitud total promedio de una muestra de las sardinas del Pacífico, <i>Sardinops sagax caeruleus</i> , recolectadas durante los meses Junio-Agosto del 2007 (\pm desviación estándar).	44
VI	Parámetros de calidad del agua del sistema de recirculación para la sardina del Pacífico, <i>Sardinops sagax caeruleus</i> , durante el periodo de Junio del 2007 a Marzo del 2008, bajo un régimen natural de fotoperiodo y sin control de temperatura. Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar. NAT, nitrógeno amoniacal total.	45
VII	Diagnóstico del estado de madurez sexual de las gónadas de <i>Sardinops sagax caeruleus</i> . IGS: Índice gonadosomático.	49
VIII	Análisis de las gónadas de la sardina del Pacífico, <i>Sardinops sagax caeruleus</i> después de la inducción con GnRHa. IGS: Índice gonadosomático.	52

Lista de Tablas (continuación)		
Tabla		Página
IX	Parámetros de calidad del agua del sistema de recirculación para la sardina del Pacífico <i>Sardinops sagax caeruleus</i> , durante el periodo de Julio a Octubre del 2008, bajo un régimen controlado de fotoperiodo y temperatura. Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar. NAT, nitrógeno amoniacal total.	57
X	Longitud y peso promedio de la sardina del pacífico <i>Sardinops sagax caeruleus</i> expuesta a condiciones controladas de luz y temperatura durante el periodo de Julio a Octubre del 2008.	57
XI	Cuentas por minuto (CPM) y coeficiente de variación (CV) de los radioinmunoensayos (RIA) de las fracciones libres de los esteroides de la sardina del Pacífico. Los valores corresponden a la media \pm desviación estándar de la media.	69

I. INTRODUCCIÓN

México se encuentra entre los 20 primeros países del mundo por el volumen de su producción pesquera (1.5% de las capturas mundiales), lo que representa una fuente importante de divisas para el país (SAGARPA, 2001). A nivel nacional, las pesquerías de pelágicos menores aportan alrededor de un 40% de las capturas totales, de las cuales, la mayor parte provienen del noroeste de México, principalmente del Golfo de California (Lluch-Belda, *et al.*, 1986). En Ensenada, B. C., las especies que se extraen son: sardina del Pacífico *Sardinops sagax caeruleus* (80%), macarela *Scomber japonicus* (11%), anchoveta norteaña *Engraulis mordax* (8%) y charrito *Trachurus symmetricus* (1%) (García y Sánchez, 1997).

Una parte de la actividad humana productiva se basa en el aprovechamiento de los recursos naturales renovables y dado que algunos de estos presentan signos de abatimiento, durante los últimos años se ha dado mayor importancia a la regulación de las actividades pesqueras, con el fin de disminuir la presión sobre las poblaciones ícticas sobreexplotadas. Un claro ejemplo es la sardina del Pacífico, esta especie pertenece a la Familia Clupeidae y es uno de los principales grupos de vertebrados no domesticados utilizados por el hombre, son también, tanto en número como en peso, el producto pesquero más importante en aguas mexicanas (Lluch-Belda, *et al.*, 1986).

Después de la década de los cincuenta esta especie casi desapareció de la región al norte de Punta Concepción. El colapso de la población se debió a la gran explotación en las costas de California, combinada con la pérdida de hábitat a causa del cambio climático, que enfrió las aguas en la región este del pacífico norte, posteriormente la población se concentró cerca de la región central y sur de Baja California. A principios de los años setenta se registró una gran abundancia de sardinas en el Golfo de California, que se ha mantenido

hasta el presente. Para los años ochenta y noventa, la población aparentemente se había restablecido a lo largo de su intervalo original de distribución (Baumgartner *et al.*, 1992).

Los fuertes cambios de distribución geográfica y abundancia de los pelágicos menores han marcado la pauta en el desarrollo de sus pesquerías. La caída y posterior recuperación de la biomasa de la sardina en el océano Pacífico desde finales de los ochenta es tema de debate, se desconoce con precisión el efecto del esfuerzo pesquero y del ambiente en estos cambios (Wolf, 1992). La flota pesquera ha cambiado en tamaño y estructura a lo largo del tiempo, originalmente constaba de barcos camaroneros y atuneros con capacidad de bodega entre 40 y 100 toneladas. A mediados de los años setenta se incorporaron cerca de dos docenas de barcos peruanos con bodega de 120 t y algunos de 300 t, ello fue parte de la instrumentación del Plan Nacional de Desarrollo Pesquero (García-Crespo *et al.*, 1982; Lluch-Belda *et al.*, 1995).

Al inicio de la pesquería, los lances se hacían por la noche, en "oscuros" lunares del cuarto menguante al creciente. Con la incorporación de tecnología de búsqueda como el sonar y la ecosonda, ahora la captura se puede realizar durante el día. Esto también hizo que la pesca se alargara de dos semanas a tres o más, y con la incorporación de avionetas para ubicar los cardúmenes y dirigir la maniobra, el poder de pesca se ha desarrollado en gran medida. Existen dudas acerca de los niveles que estas pesquerías podrían alcanzar. Durante este siglo, las oscilaciones en las capturas de la sardina de California, Japón y Chile han estado sincronizadas, sugiriendo que un proceso común podría controlar la abundancia de sardina en el Pacífico (Lluch-Belda, *et al.*, 1989).

La más reciente evaluación de biomasa de sardina del Pacífico de la costa occidental de Baja California se realizó con el modelo CANSAR (Catch at Age Análisis for Sardine, Deriso *et al.*, 1996). Este es un modelo estructurado para

evaluación de poblaciones derivado del modelo CAGEAN (Deriso *et al.*, 1985). CANSAR utiliza diversos índices de abundancia independientes de la pesquería como: Producción de huevos, Abundancia, Área de desove, Biomasa desovante, Captura semestral. Dicho modelo fue diseñado para utilizar datos de las pesquerías de Ensenada, B. C., y de California, E.U.A. con el propósito de simular la dinámica de la población de sardina y estimar su rendimiento.

Hay buenas expectativas para la pesquería de sardina en Ensenada, B. C. El hallazgo de sardinas de más de 5 años tan al norte de Canadá es un buen indicador de que la sub-población se está expandiendo. La biomasa de sardina del Pacífico sigue creciendo y esto se refleja en la captura comercial (INP), por lo cual se prevé seguir desarrollando más modelos de predicción independiente y derivada de la pesquería como, estaciones de monitoreo ambiental, estructura de edad, y reproducción basados en la variabilidad y dinámica estacional a las que esta sujeta la sardina para poder establecer la talla legal de primera captura y poder predecir cambios en la población. En la costa occidental de la península de Baja California participan varias dependencias como la red IMECOCAL (Investigaciones Mexicanas de la Corriente de California), extensión del Programa CalCOFI (California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations), que tienen como objetivo el monitoreo ambiental y biológico de la corriente de California, hábitat de los pelágicos menores (INP). Este Programa cuenta con la participación, además del Instituto Nacional de la Pesca (INP), de instituciones como el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR), el Centro de Investigaciones Biológicas del Norte (CIBNOR), el Centro de Investigación Científica y de Estudios Superiores de Ensenada (CICESE) y del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL-UNAM), por parte de Estados Unidos, Institution of Oceanography, US. San Diego (SCRIPPS), Southwest Fisheries Science Center (SWFSC) y California Department of Fish and Game (CDFG).

Sardinops sagax se distribuye en los mares templados (Parrish, *et al.*, 1989), conformando tres linajes, el primero se encuentra en el sur de África (*ocellatus*)

y Australia (*neopilchardus*); el segundo en Chile (*sagax*) y California (*caeruleus*), y el tercero en Japón (*melanostictus*) (Grant, *et al.*, 1998). En particular, *Sardinops sagax caeruleus* se distribuye a lo largo del Océano Pacífico entre las latitudes 60 y 50 °N, desde el sur de Alaska hasta la península de Baja California, México, incluyendo el Golfo de Cortés (Culley 1971; COSEWIC 2002). Esta especie tiene una función importante en el ecosistema, debido a que es una fuente de alimento para otros organismos marinos como los atunes (COSEWIC, 2002). Desde el punto de vista socioeconómico es un recurso importante que se utiliza como alimento para el consumo humano, como carnada para la pesca deportiva y como ingrediente indispensable (harinas y aceites) en las dietas formuladas para animales terrestres o acuáticos (Frimodt, 1995).

La Sardina del Pacífico es una especie costera y pelágica; forma grandes cardúmenes y se encuentra en masas de agua cuya temperatura está en el intervalo de 16 a 23°C en el verano y de 10 a 18°C en el invierno, durante el periodo de reproducción se encuentra en aguas con temperaturas de 13° a 22°C, aunque el óptimo térmico para el desove es de 18°C (Ahlstrom, 1960; Lluch-Belda, 1986). Por el efecto de la fluctuación de la temperatura, esta especie tiene una distribución horizontal y vertical en la columna de agua, por lo tanto, es una especie migratoria y no se encuentran en un mismo lugar todo el año. Se alimentan por filtración (Radovich, 1952, Ahlstrom 1960, López-Martínez, 1991), su dieta esta compuesta de fitoplancton y zooplancton, principalmente copépodos y larvas de braquiuros (López-Martínez. *et al.*, 1999). Estos organismos son ovíparos, con huevos y larvas pelágicas (Culley, 1971; COSEWIC, 2002).

Como el avance y la orientación de la investigación pesquera no alcanza a satisfacer las necesidades de información que permita comprender las relaciones entre la pesca y el ambiente y entre la ordenación y el desarrollo pesquero, experimentos de laboratorio contribuirán con información básica

sobre los efectos del ambiente en los primeros estadios de la vida de las especies de importancia biológico-pesquera, en especial aquellas con las que cuenta el país. En este sentido el control de la reproducción en cautiverio es una herramienta fundamental en la producción de material biológico necesario para la realización de experimentos orientados a la generación de estos conocimientos.

Entre las investigaciones que conciernen a los parámetros reproductivos, el análisis del desarrollo gonadal es el primer paso hacia el estudio de las etapas tempranas de la historia de vida de las especies. La aproximación más simple involucra el estudio de la reproducción en condiciones controladas de los factores ambientales.

1.1. Fisiología del desarrollo gonadal

El ciclo reproductivo de los peces se puede separar en dos fases: En la primera se da la diferenciación de las gónadas, la proliferación mitótica de las células germinales y el crecimiento de los gametos, y en la segunda fase la maduración final y la liberación de los gametos maduros (Nagahama, 1994). En las hembras, esta primera fase se refiere al proceso de la vitelogénesis, el principal evento es la producción de los precursores proteicos y lipídicos de la vitelogenina y su acumulación en el ovocito (Specker y Sullivan, 1994). En los machos, esta etapa del ciclo reproductivo se refiere a la espermatogénesis que culmina con la producción de espermatozoides flagelados inmóviles (Billard, 1986; Callard, 1991).

Durante la segunda etapa del ciclo reproductivo de las hembras, la maduración final del ovocito incluye un número de cambios citológicos y bioquímicos, que lo preparan para la ovulación, desove y fertilización (Nagahama, 1983; Jalabert *et al.*, 1991). La maduración final del ovocito comienza con la migración del núcleo o vesícula germinal hacia la periferia, a la par ocurre la coalescencia de los gránulos de vitelo y lipídicos, seguidos por el breve proceso de la hidratación y

el rompimiento de la membrana nuclear y la desaparición de la vesícula germinal o núcleo, en la región próxima al micrópilo que es el sitio de entrada del espermatozoide (Guraya, 1986). El proceso de maduración final de los espermatozoides, la espermiación, abarca la adquisición de la capacidad motil y la producción de esperma viable (Nagahama, *op cit*). En algunos peces, la espermatogénesis y la espermiación están temporalmente separadas, la espermiación ocurre después de concluida la espermatogénesis. Así, durante la temporada de desove los testículos contienen exclusivamente espermatozoides viables. En otras especies, los dos procesos pueden ocurrir simultáneamente (Billard, 1987).

La reproducción en los vertebrados es regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada. El hipotálamo integra la información sensorial endógena y exógena, entonces produce la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), cuyo órgano blanco es la hipófisis o pituitaria, en esta glándula se sintetizan dos gonadotropinas (GtH I y GtH II) (Swanson, 1991). La GtH I regula la vitelogénesis en las hembras y la espermatogénesis en los machos. La GtH II es la encargada de la maduración final del ovocito en las hembras (MFO) y de la espermiación en los machos.

La estimulación gonadotrópica del ovario durante la vitelogénesis resulta en la producción de testosterona (T) por las células de la teca, esta hormona es transferida a las células de la granulosa, donde es transformada por la enzima aromatasa en 17β -estradiol (E_2), (Nagahama, 1983). En respuesta a la estimulación por el E_2 , el hígado produce vitelogenina, la lipoproteína precursora de vítelo y la secreta al torrente sanguíneo (Specker y Sullivan, 1994), la cual es incorporada por endocitosis por los ovocitos en crecimiento. Al final de la vitelogénesis, la hipófisis deja de producir GtH I, así como E_2 . En esta etapa de la gametogénesis, la hipófisis produce GtH II, que induce la síntesis del esteroide inductor de la maduración (EIM) $17\alpha,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona, ($17,20 \beta$ -P). Para la formación del EIM intervienen las dos capas celulares

de la cubierta folicular. A partir del colesterol las células de la teca producen el esteroide 17α -hidroxiprogesterona que atraviesa la lámina basal y se difunde hacia las células de la granulosa donde es convertido en $17,20\beta$ -P (Zohar, 1989). El EIM estimula el proceso de maduración final, que se caracteriza por la migración y posterior rompimiento de la vesícula germinal (VGBD).

El inicio de la espermatogénesis se asocia con una elevación de los niveles de andrógenos en el plasma (Borg, 1994). Aunque existen diferencias entre especies, el andrógeno más importante es 11 ketotestosterona (11-KT). Durante la última etapa de la maduración de los espermatozoides (espermiación), se observa un incremento en la concentración de progestágenos en el plasma, frecuentemente mayor que la concentración del MIS en las hembras (Scott *et al.*, 1984; Liley y Rouger, 1990).

En las últimas dos décadas, las terapias confiables y eficientes de inducción del desove en peces han sido posibles gracias a los avances en la endocrinología y en la química de péptidos (Zohar, 1996). Usualmente, una hormona homóloga o heteróloga es inyectada para estimular la maduración gonadal, resultando en la ovulación o la espermiación en un tiempo predecible. Estas hormonas pueden incidir en los niveles del eje hipotálamo-hipófisis-gónada.

1.2. Reproducción y talla de primera madurez

Existen dos regiones donde la sardina del Pacífico *Sardinops sagax caeruleus* desova en dos temporadas del año. La región del norte al sur de California, donde se registran desoves de Febrero a Julio y la región sur en Punta Eugenia, Baja California Sur, México, donde se registran desoves de Agosto a Octubre. La zona de transición entre estos dos patrones podría encontrarse en Punta Baja, Baja California, México (Hernández-Vázquez, 1994). Con una talla de primera madurez de 17 cm, las hembras pueden producir de 30,000 a 65,000 huevos en una temporada, pero las de mayor talla pueden producir hasta 200,000 huevos durante una temporada.

II. ANTECEDENTES

La reproducción de los organismos se produce por la tenga sincronía en la maduración de las gónadas de los reproductores y las variaciones de los factores ambientales. Esta sincronización permitirá que los individuos maduren simultáneamente para garantizar una mayor supervivencia de la progenie (Carrillo y Zanuy, 1993). En el ciclo reproductivo de los peces teleósteos, ésta sincronización con los factores ambientales resulta de gran importancia debido a que presentan cambios cíclicos en sus niveles hormonales y viven en un medio que experimenta marcadas variaciones estacionales en la longitud del día, la temperatura, el oxígeno disuelto, la salinidad, el pH, la disponibilidad de nutrientes y los factores sociales principalmente. Así, cada individuo debe disponer de un sistema que reciba la información procedente tanto del exterior como de su interior, que las integre y determine el establecimiento de un estado endocrino idóneo que a su vez, regule todos los eventos fisiológicos que conducirán a la reproducción (Carrillo y Zanuy, 1993).

Estas complejas funciones se llevan a cabo a través de múltiples interacciones que tienen lugar a lo largo del eje **cerebro-hipófisis-gónada** (Kah *et al.*, 1993). El sistema nervioso central desempeña un papel relevante en el control de la reproducción integrando procesos extrínsecos e intrínsecos. En primer lugar es el encargado de integrar las señales externas (factores ambientales) e internas (hormonales) y, en segundo lugar, debe transmitir las señales a los efectores endocrinos, a través de una acción moduladora sobre la actividad de la hipófisis.

Existen numerosos estudios sobre los mecanismos centrales de control de la reproducción de peces teleósteos, tanto en sus aspectos fisiológicos como anatómicos. (Peter *et al.*, 1991; Kah *et al.*, *op cit*). También existen trabajos referentes a los parámetros que regulan las respuestas fisiológicas de los organismos, entre ellas está la respuesta reproductiva en los peces (Mañanós *et*

al., 1997). En los pelágicos menores es necesario intentar explicar el efecto de la variabilidad ambiental sobre los procesos de reclutamiento. A estas especies se les atribuye una vulnerabilidad relacionada con los procesos reproductivos, ya que son extremadamente sensibles a las variaciones ambientales, lo que afecta directamente los procesos de maduración sexual y desove así como el desarrollo y sobrevivencia de los huevos, larvas y juveniles, que constituirán el reclutamiento a las poblaciones pesqueras (Álvarez y Butler, 1992; Dimmlich *et al.*, 2004; Abaunza *et al.*, 2003; Maes *et al.*, 2005).

En 1931, Clark, publicó los resultados del estudio de la maduración de los ovarios de la sardina de California *Sardinops sagax caeruleus* por medio del análisis de la distribución modal de los diámetros de los ovocitos en hembras adultas provenientes de las capturas comerciales en diferentes latitudes del Estado de California, el estudio comprendió un periodo de 11 años, de acuerdo con los meses lunares. En las 12 temporadas que comprendió el estudio se establecieron las temporadas de desove, la talla de primera madurez y la cantidad de desoves en cada localidad. Para clasificar el grado de madurez sexual, utilizando la clasificación del Consejo Internacional para la Exploración del Mar (International Council for the Exploration of the Sea, Wood, 1930). El criterio de clasificación fue el diámetro de los ovocitos y su frecuencia en una muestra de la gónada. La clasificación consta de cinco categorías con 12 estadios, cada uno definido por el diámetro de los ovocitos:

- 1) Inmaduro, estadio A (modas entre 0 y 0.2 mm).
- 2) Madurando con ovocitos opacos, estadios B (entre 0.22 y 0.26 mm), C (entre 0.26 y 0.34 mm), D (entre 0.34 y 0.44 mm), E (entre 0.44 y 0.54 mm), F (entre 0.54 y 0.64 mm) G (entre 0.64 y 0.74) y H (entre 0.74 y 0.84 mm).
- 3) Madurando con ovocitos transparentes, estadios I (entre 0.84y 0.94 mm), J (diámetros alrededor de 0.94 mm).

4) Maduros con ovocitos libres en el oviducto, estadio K (con frecuencias de 0.94 mm o más).

5) En reabsorción o recuperación, estadio L (alrededor de 0.20 mm).

Para establecer los criterios para la recomendación de vedas reproductivas para la anchoveta peruana *Engraulis ringens* y la sardina del Pacífico *Sardinops sagax sagax*, Perea y Buitrón (1996) estudiaron los ovarios de organismos desovantes y en recuperación durante la temporada reproductiva. Los autores establecieron los picos de desove y estimaron el porcentaje de ovarios con folículos post-ovulatorios (FPO) y ovocitos hidratados (OH), también establecieron la época de declinación de los desoves (ovocitos atrésicos OA). El valor para la anchoveta fue de 18.4% de FPO más OH en verano y 27.7% en invierno. Durante la estación de verano e invierno se cuantificó un 16.75% de ovocitos atrésicos. En el caso de la sardina, el valor para hembras fue del 16.5% de FPO y OH en verano y 12.8 % en invierno; para ovarios con OA durante la estación de verano e invierno el porcentaje fue de 13.6 %.

Jiménez *et al.* (2003) realizaron un estudio de la espermatogénesis de la merluza *Merluccius merluccius* como pasos fundamentales para su cultivo en un periodo de experimentación de octubre de 2003 a septiembre de 2004. La estimación del periodo de puesta se basó en la proporción de individuos que se encontraban en los distintos estadios de maduración ovárica y testicular, y en la evolución mensual del índice gonadosomático. En las hembras, el estado previtelogénico fue el más frecuente, en mayo el 100% de los ejemplares se encontraban en esta condición. El periodo de puesta fue breve y ocurrió entre junio y septiembre. Los ovocitos se hidrataron y fueron liberados rápidamente. En los machos, por el contrario, los estadios más frecuentes fueron el de desove y post-desove en agosto (80% de los individuos analizados). Es de destacar la escasez de individuos que se encontraron en la etapa de desarrollo gonadal avanzada y de maduración final.

Prat *et al.* (2001) realizaron un estudio sobre el efecto de la GnRH α y un antidopaminérgico (pimozide PIM), sobre los niveles de esteroides en el plasma y en el desarrollo ovárico de *Dicentrarchus labrax* L. El experimento consistió de cinco tratamientos, la dosis se aplicó en dos etapas con un intervalo de 12 horas entre la primera_(i) y segunda inyección_(f): 1) 5 y 20 μg de GnRH α kg^{-1} ; 2) 5_(i) μg de GnRH α kg^{-1} + 10 μg kg^{-1} de PIM y 20_(f) μg de GnRH α kg^{-1} ; 3) 5_(i) y 20_(f) μg de GnRH α kg^{-1} + 10 μg kg^{-1} de PIM; 4) un grupo control con solución salina y; 5) un grupo control sin tratamiento. Solo se emplearon hembras que se encontraban en la etapa de vitelogénesis tardía y machos espermiantes. Los resultados con GnRH α solo o combinado con pimozide aceleró la maduración final de los ovocitos y el desove, sin embargo, el número de huevos desovados por los organismos tratados con GnRH α fue mayor que los tratados con GnRH α + PIM. Los niveles plasmáticos de estradiol se incrementaron rápidamente 12 horas después de la primera inyección, y disminuyeron en la segunda aplicación, particularmente cuando se aplicó PIM. Los niveles plasmáticos de testosterona aumentaron cuando los niveles de E₂ decrecieron y la concentración plasmática del EIM fue baja.

Plaza *et al.* (2002) analizaron la fecundidad intra-anual, la fecundidad por desove, la fecundidad total y la longitud de los ovarios maduros de la sardina del Pacífico *Sardinops sagax sagax* del norte de Chile, durante un ciclo anual, comprendido de Abril de 1992 a Marzo de 1993. Los ovocitos se clasificaron en clases de acuerdo con sus diámetros y se definió la moda intermedia (ODIM) de 200 a 400 μm y de la moda más avanzada (ODAM) de 450 a 650 μm . Obteniendo ovocitos de mayor tamaño en invierno que en verano.

Da Silva *et al.* (2003) estudiaron la maduración del ovario en tres especies de peces neotropicales de la familia Hemiodontidae, de acuerdo al análisis de las características microscópicas del ovario definieron una escala de maduración para *Hemiodus microlepis*, *H. Ternetzi* y *H. unimaculatus*. Los elementos considerados para esta escala fueron, la composición del citoplasma, nucleolos,

zona radiata, epitelio folicular y diámetro de los ovocitos, dichas características fueron agrupadas en cinco estadios de desarrollo gonadal, maduración inicial; maduración avanzada; maduro, desovado y en recuperación.

En los peces pelágicos menores, los diferentes aspectos de la fisiología de la reproducción se conocen poco. Olmedo *et al.* (1990) estudiaron la inducción al desove de la sardina *Sardina pilchardus* en cautiverio, el método de inducción consistió en una inyección inicial de 125 UI de gonadotropina corionica humana y 24 horas después con 100 UI combinado con 10 mg de extracto de pituitaria. La inducción dio resultados positivos con organismos recién capturados y negativos con organismos aclimatados.

Cisneros *et al.* (en prensa) estudiaron el efecto de la GnRH α y domperidona (DOM, antidopaminérgico) sobre el desove en cautiverio de la anchoveta peruana *Engraulis ringens*. En su estudio mostraron que la inducción con GnRH α es suficiente para estimular la maduración de los ovocitos y producir el desove, sin la necesidad de un antidopaminérgico, ya que este antagonista de la dopamina inhibió ligeramente el desove. Si bien, los porcentajes de desove de las anchovetas tratadas con GnRH α a las 24 y 48 horas posteriores a la inyección fueron similares, el análisis histológico mostró folículos post ovulatorios (FPO) de cero horas en el grupo expuesto a una combinación de GnRH α y DOM y de un día en el grupo inyectado solo con GnRH α , lo cual indica que todos los desoves con GnRH se produjeron a las 24 horas. Aunque esta metodología permitió obtener óvulos, el tamaño de los desoves no fue suficiente, lo que probablemente se debe a que se requieren dosis mayores de GnRH α para lograr desoves adecuados.

Sardinops sagax caeruleus es el principal recurso que sustenta la pesquería de pelágicos menores en México, por lo que se requiere la utilización de modelos que integren información dependiente e independiente de la pesquería para su entendimiento y manejo, para ello es necesario tener nuevas fuentes de información, comenzando con los aspectos reproductivos de la especie.

Los estudios de la fisiología reproductiva de la sardina del Pacífico, servirán de base para entender las etapas finales de la maduración gonadal, en particular para el grupo de sardinas de agua templada que se distribuye en la costa oeste de Baja California, según el modelo propuesto por Felix-Uraga *et al*, (2005).

III. OBJETIVOS

III.1. Hipótesis

- La sardina del Pacífico *Sardinops sagax caeruleus* expuesta a un régimen de acondicionamiento de fotoperiodo y temperatura experimenta cambios citológicos y nucleares en las gónadas durante la gametogénesis.
- Una vez completada la ovogénesis en las hembras y espermatogénesis en los machos, el suministro de un análogo de la hormona liberadora de gonadotropinas elevará los niveles plasmáticos de esteroides endógenos inductores de la maduración final.

III.2. Objetivo General:

Analizar la maduración gonadal e inducir al desove de la sardina del Pacífico *Sardinops sagax caeruleus*.

III.2.1. Objetivos particulares:

- 1.** Describir la estructura macro y microscópica de las gónadas de *Sardinops sagax caeruleus*.
- 2.** Elaborar una escala de maduración gonadal para la sardina que se distribuye en la costa oeste de Baja California.
- 3.** Evaluar el efecto de la GnRHa sobre la maduración final de la sardina del Pacífico.

IV. METODOLOGÍA

Los experimentos se realizaron en el laboratorio del departamento de acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

Durante el periodo de Junio a Agosto del 2007 se adquirieron cinco muestras de sardinas de las capturas dedicadas a la pesca deportiva y que fueron capturadas en las áreas tradicionales de pesca para la localidad de Ensenada (desde San Quintín hasta Rosarito, Baja California). La muestra reclutada consistió de 323 organismos aproximadamente, los cuales se trasladaron en bolsas de polietileno con agua saturada a presión con oxígeno. En el laboratorio, los organismos fueron colocados en tanques de 1500 l y se sometieron a un tratamiento profiláctico por tres días, que consistió en baños diarios de 3 horas con oxitetraciclina.

IV.1. Maduración gonadal

IV.1.1. análisis macro y microscópico

Se realizó un muestreo de las gónadas para hembras y machos durante el periodo experimental (Junio de 2007 a Octubre de 2009) y con la ayuda de un estereoscopio (marca wild heerbrugg) se observaron sus características macroscópicas: la longitud que las gónadas ocupaban en la cavidad abdominal, tamaño, peso y color. Después se tomó una muestra de la gónada en fresco y con la ayuda de un microscopio compuesto (marca olympus, modelo bh-2 con aumentos de 40X y 100X) se midieron y clasificaron los ovocitos de acuerdo a su diámetro, entre mayor sea este, mayor será el grado de maduración.

Para realizar un diagnóstico de la madurez sexual en las hembras, se introdujo un catéter estéril de polietileno de 800 μm de diámetro por el poro genital. En los machos, el grado de madurez sexual se evaluó por presión abdominal hasta que se observó la expulsión de semen.

IV.1.2. Análisis histológico

Para el análisis histológico, las gónadas de los peces fueron fijadas en soluciones de Bouin y Davison, en ambos casos la fijación fue por 24 horas y posteriormente se preservaron en alcohol al 70%. Las gónadas fueron procesadas por la técnica de infiltración de parafina (Humason, 1979). Se realizaron los cortes histológicos de 5 μm de espesor los cuales se tiñeron con Hematoxilina-Eosina y se elaboró una lámina por duplicado de cada gónada. Los cortes histológicos fueron observados en un microscopio invertido Marca olympus, modelo ckx41 con aumentos de 40X, 100X, 400X para describir y analizar las características celulares y el diámetro de los ovocitos.

IV.1.3. Determinación del diámetro teórico

Con la finalidad de elaborar una clave de maduración gonadal para la sardina *S. sagax caeruleus*, que complementará la clasificación propuesta por Clark, (1931), se realizó un análisis de la maduración de las gónadas considerando las características celulares del los ovocitos. Esta clave sirvió para determinar el momento adecuado para la inducción hormonal de la ovulación, espermiación y el desove de la sardina en cautiverio.

Las láminas histológicas fueron observadas al microscopio y se seleccionaron aleatoriamente cinco campos con una amplificación de 40X de los cuales se obtuvieron fotografías digitales con una cámara olympus, modelo c-5060, y se procesaron por análisis de imágenes con el programa de cómputo SigmaScan Pro 5. La superficie de cada ovocito se midió dibujando el área, que se calculó en píxeles (previamente calibrados) y expresó en μm^2 . Partiendo del área calculada, se determinó el diámetro teórico (DT) con la formula de Briarty (1975):

$$DT = \sqrt{4A/\pi} \quad (1)$$

Se midieron todas las células mayores a 200 μm que se encontraban en el mismo estadio de desarrollo, para evitar el sesgo que producen los cortes que

atravesan a las células en una posición diferente a su ecuador, En la medición se consideraron todas las células con su núcleo visible y de un estadio particular hasta obtener el mayor diámetro posible, es decir, cuando la medición de las células no significara un incremento posterior en el diámetro máximo. Para cada estadio se calculo la frecuencia relativa y la proporción que guarda el núcleo con respecto al diámetro del citoplasma.

Las células con un diámetro inferior a 200 μm son inmaduras, por lo que no se incluyeron en la cuantificación ni en la clasificación de los diferentes estadios de maduración.

IV.2. Maduración de *S. sagax caeruleus* con régimen natural de fotoperiodo y temperatura

IV.2.1. Acondicionamiento de los organismos

El acondicionamiento y maduración de los peces se realizó en un estanque de membrana de polietileno de 7000 l (3 m de diámetro) equipado con un sistema de filtración mecánico-biológica (BubbleBead filter). Los peces se alimentaron diariamente *ad libitum*, con una dieta formulada para trucha (alevín # 2) con 52% de proteína y 14% de grasa (silver cup).

IV.2.1.1. Parámetros Físicoquímicos

Diariamente se registró la temperatura, la concentración de oxígeno disuelto, temperatura y la salinidad mediante un analizador de oxígeno, conductividad y temperatura YSI modelo 85 (Yellow Springs Instrument) y el pH con un potenciómetro digital marca Hanna pH modelo Pen pHep 5. El nitrógeno amoniacal total (NAT), el nitrito (N-NO_2^-) y el nitrato (N-NO_3^-) se midieron con un kit colorimétrico (marine lab, red sea) y la alcalinidad con un kit colorimétrico (lamotte modelo wat-dr).

IV.2.1.2. Factor de condición

Con la información de peso y longitud se calculó el factor de condición expresado matemáticamente por Fultón (1902) como:

$$K = (P/L^3)*100 \quad (2)$$

donde: P= peso del pez (g)

L= longitud del pez (cm)

El factor de condición se utilizó como índice del estado de bienestar de las sardinas al momento de la captura y como una medida del grado de adaptabilidad de los peces al laboratorio.

IV.2.1.3. Índice gonadosomático

Se tomó como indicador de la madurez sexual y se calculó de acuerdo con la expresión:

$$IGS = (PG/PC)*100 \quad (3)$$

donde PG = Peso de la gónada

PC = Peso de la carcasa (cuerpo del pez eviscerado), ambos expresados en gramos (Zanuy y Carrillo, 1973).

IV.2.2. Diagnóstico de la madurez gonadal

A partir del periodo que comprendió del mes de Junio del 2007 a Marzo del 2008 se comenzó a diagnosticar el estado de madurez de los organismos y a definir el momento adecuado para realizar la inducción al desove. Durante este tiempo, no se controlaron la temperatura del agua en los tanques de cultivo ni el fotoperiodo, por lo que variaron de acuerdo a la fluctuación natural. La intensidad de la luz natural fue reducida al 95% con mallasombra durante el periodo de diagnóstico de maduración gonadal, previo al experimento de inducción.

IV.2.3. Inducción al desove con GnRHa

El 17 de Marzo del 2008, una muestra de 36 sardinas se indujo al desove utilizando un análogo de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRHa, cystorelin®, merial). Se colocaron 3 grupos por duplicado, conformados por 6 organismos (hembras y machos adultos). Cada grupo se mantuvo en estanques de 275 litros, llenos con agua de mar al 80 % de su volumen total, cada estanque estuvo conectado a un sistema de recirculación con agua de mar filtrada y esterilizada con UV, la concentración de oxígeno se mantuvo cerca del valor de saturación con aireación constante.

Cada organismos fue anestesiado con tricaina (Western Chemical, E.U.A) a una concentración de 40 mg l⁻¹ y después se le inyectó intraperitonealmente la hormona GnRHa, utilizando jeringas de 1.0 ml con aguja para insulina. Los tratamientos consistieron en dos dosis de la hormona, GnRHa de 5 y 20 µg kg⁻¹ de peso corporal del pez, más un grupo control sin tratamiento (**Tabla I**).

Tabla I. Protocolo para la primera administración de GnRHa.

<i>Tratamiento</i>	<i>1ra. Inyección (0 hrs)</i>	<i>2da. Inyección (72 hrs)</i>	<i>Repeticiones</i>
GnRHa ₅₋₂₀	5 µg de GnRHa kg ⁻¹	20 µg de GnRHa kg ⁻¹	2
GnRHa ₂₀₋₅	20 µg de GnRHa kg ⁻¹	5 µg de GnRHa kg ⁻¹	2
Control	Sin inyección	-----	2

Después de aplicar el análogo sintético de la hormona liberadora de gonadotropinas y con la intención de detectar la presencia de huevos de sardina, se realizó un monitoreo de los estanques de reproducción cada seis horas, hasta completar 72 horas posteriores a la inyección, pasando por la superficie del agua una malla de 400 µm. Como la inducción no fue exitosa en

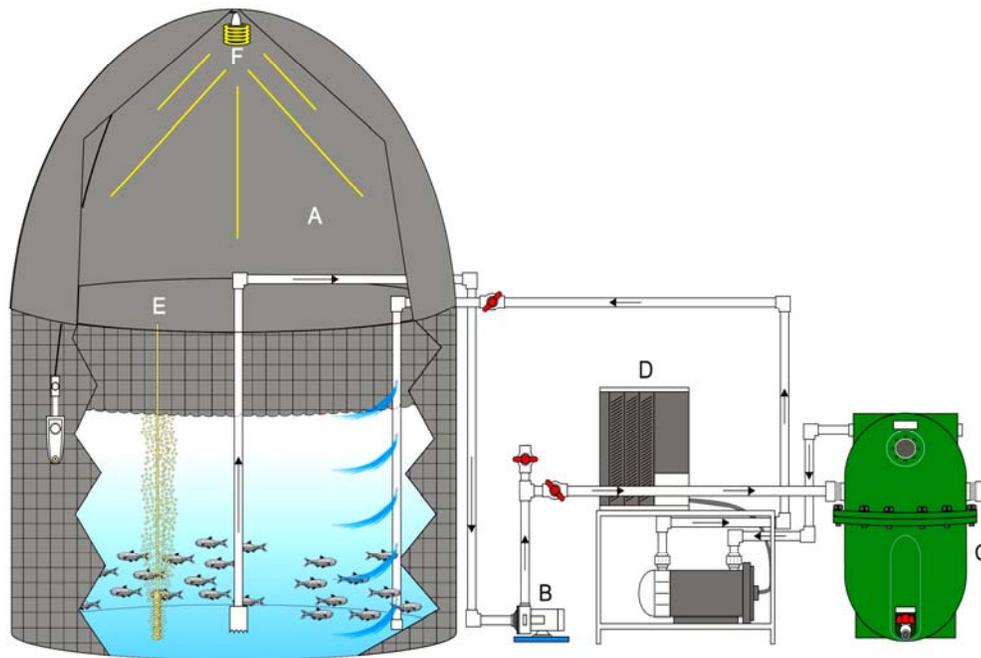
ninguno de los tratamientos se aplicó una segunda inyección solo a los organismos de los tratamientos con dosis hormonal (5,20 y 20,5; **Tabla I**) y se repitió el monitoreo de huevos como en las anteriores 72 horas.

IV.3. Maduración de *S. sagax caeruleus* bajo un régimen artificial de fotoperiodo y temperatura

Como la respuesta a la inducción hormonal no fue exitosa, durante el mes de Mayo de 2008 se reinició el proceso de maduración de las sardinas, controlando el fotoperiodo y la temperatura.

IV.3.1. Acondicionamiento de los organismos

Los organismos se colocaron en un estanque de membrana de polietileno de color negro con fondo plano de 7 m³ (conteniendo 80% de su volumen de agua), el cual se encontraba en el interior del laboratorio de reproducción de peces marinos, donde las condiciones experimentales fueron más adecuadas, sin perturbación por el tráfico de personas o vehículos. También se incorporó un sistema de recirculación con una motobomba de ¾ hp y biofiltración (polygeyser beadfilter de 6 ft³), con un diseño que aseguró la eliminación eficientemente de los residuos orgánicos (materia fecal, restos de alimento y escamas. Con la finalidad de mejorar el estado nutricional de las sardinas, además del alimento formulado, se suministró un complemento alimenticio especial para la reproducción de peces marinos (fish breed-m, inve) en una proporción 50:50. Para la manipulación de la temperatura se utilizó una bomba de calor de 18,000 BTU (aqualogic) y para el manejo del fotoperiodo se utilizó un bulbo fluorescente de 23 W (conserv-energy, modelo bpce23tm/4) colocado a 120 cm sobre la superficie del agua (**Fig.1**).



Dibujo: Francisco Valenzuela Buriel

Fig. 1. Diagrama del sistema experimental de recirculación, en condiciones controladas de luz y temperatura, A: Tanque, B: Motobomba, C: Biofiltro, D: Bomba de calor, E: Aireación y F: Luz.

El régimen de luz y temperatura fue diseñado para simular una fase del ciclo reproductivo correspondiente al final del invierno e inicio de la primavera, periodo durante el cual, las sardinas maduran en su ambiente natural, el ciclo se comprimió experimentalmente a 11 semanas, durante las cuales las sardinas se acondicionaron con el objeto de acelerar la maduración gonadal. Durante las primeras seis semanas se comenzó a disminuir paulatinamente las horas luz y la temperatura para disparar el desarrollo gonadal y en las siguientes cinco semanas se incrementaron las horas luz y la temperatura, lo que en condiciones naturales marca el final de la vitelogénesis y la estimulación de la maduración final, por último, se expusieron por un periodo de un mes a una condición de 18 °C y 14.05 horas luz hasta observar etapas mas avanzadas de maduración (Fig. 2).

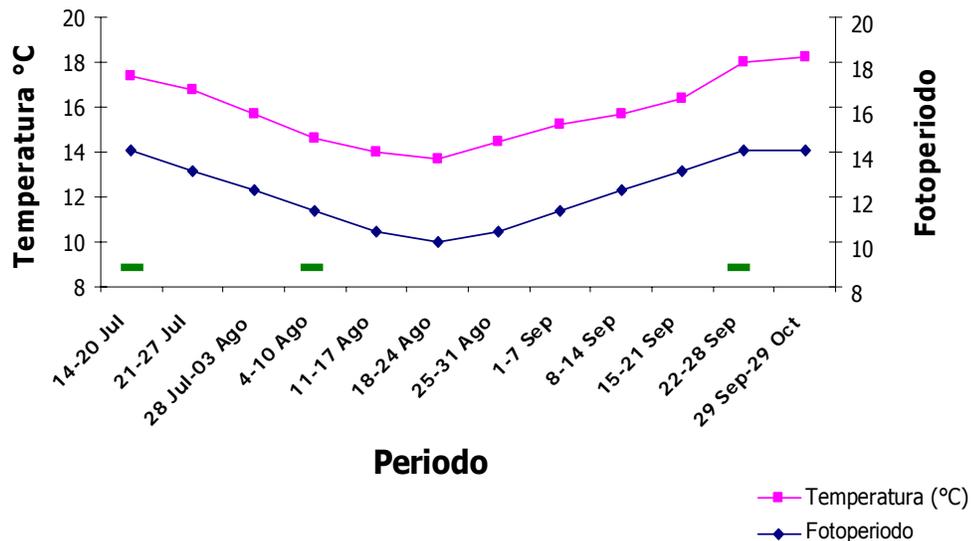


Fig. 2. Acondicionamiento reproductivo de *S. sagax caeruleus* bajo un régimen artificial de fotoperiodo y temperatura. Las barras horizontales representan el momento del muestreo del diagnóstico de madurez gonadal.

IV.3.2. Diagnóstico de la maduración

Durante el periodo de acondicionamiento reproductivo con control de fotoperiodo y temperatura, se realizaron tres muestreos para diagnosticar la madurez gonadal, ya que se requiere que los ovocitos se encuentren en el estado final de la vitelogénesis o iniciando la maduración final (migración de la vesícula germinal) para que la hormona GnRH α tenga un efecto positivo, induciendo la ovulación y el desove.

El primer muestreo se llevó a cabo el 14 de Julio de 2008 y sirvió para establecer la condición inicial de los organismos. El segundo se efectuó el ocho de Agosto del 2008 y consistió de 36 organismos que murieron accidentalmente, debido a una falla en el biofiltro. La madurez gonadal fue evaluada por medio del análisis macro y microscópico y con base en el diámetro de los ovocitos. El tercer muestreo se llevó a cabo el día 28 de Septiembre de 2008, con una muestra de 22 organismos a los cuales, a parte de analizar la maduración gonadal macro y microscópica se les extrajo sangre para cuantificar la concentración de esteroides sexuales en el plasma. Un cuarto muestreo de 24 organismos se realizó el 29 de Octubre del 2008, al término de la exposición al régimen controlado de fotoperiodo y temperatura, evaluando las mismas características que en el muestreo anterior (**Fig. 2**).

IV.3.3. Inducción al desove con GnRH α

Una muestra de 24 organismos, entre hembras y machos adultos, mantenidos bajo el régimen de 14.05 horas luz y temperatura a 18 °C durante un mes, se anestesiaron con triclaína (western chemical, E.U.A) a una concentración de 40 mg l⁻¹ y se inyectaron intraperitonealmente con la hormona análoga liberadora de gonadotropina (GnRH α , (Des-GLY¹⁰, D-ALA⁶)-LHRH etilamida: SE (I4513, sigma aldrich, E.U.A). Adicionalmente se conformó un grupo control con exposición de la luz y la temperatura pero sin tratamiento hormonal (**Tabla II**).

Tabla II. Protocolo para la segunda administración de GnRHa.

<i>Tratamiento</i>	<i>Niveles del tratamiento</i>	<i>n</i>
GnRHa	20 µg de GnRHa kg ⁻¹ de peso corporal	24
Control	Con exposición de fotoperiodo y temperatura	22

Una vez inyectado a los organismos, se realizó un monitoreo en el sistema cada seis horas, hasta completar 96 horas para observar evidencias de desove, con una red de 450 micras se filtró el agua en la superficie del tanque. En intervalos de 24 horas se sacrificaron grupos de seis organismos para evaluar y analizar la respuesta a la inducción, por medio del análisis histológico de las gónadas y la cuantificación de esteroides sexuales en el plasma.

IV.3.4. Cuantificación de esteroides sexuales en plasma de *S. sagax caeruleus*

Estos experimentos se realizaron en el Laboratorio de Endocrinología Comparada y Molecular del CCMAR de la Universidad de Algarve, campus Gambelas, Faro, Portugal, bajo la tutoría del Dr. Adelino V. M. Canario.

IV.3.4.1. Obtención del plasma

Se recolectó una muestra de sangre de los machos y las hembras adultos de la especie *Sardinops sagax caeruleus*, previo y posterior a la inducción al desove con la GnRHa bajo un régimen de acondicionamiento artificial. A cada una de las sardinas previamente anestesiadas con 2 fenoxi-etanol (2 ml/10 l) se les extrajo 1 ml de sangre directamente del corazón con una jeringa de insulina, y se colocó en tubos heparinizados de 1.5 ml (bd microtainer), posteriormente se centrifugó (vwr galaxy 7d) durante 10 minutos a 1000 rpm (Scott *et al.*, 1980). El plasma fue removido con una micropipeta, se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 ml por duplicado y se mantuvo a -20 °C hasta su procesamiento.

IV.3.4.2. Radioinmunoensayo

El principio de este método es una reacción inmunológica competitiva entre un anticuerpo y la hormona que se desea cuantificar y que se comporta como un antígeno. La cuantificación se hace al evaluar la proporción de antígenos marcados y aquellos no marcados que se unen al anticuerpo. En este caso, el antígeno marcado es la hormona que se desea cuantificar marcada con un isótopo radioactivo.

Para el análisis de RIA se utilizaron los siguientes reactivos:

- Fosfato disódico, Na_2HPO_4 (Merck-Ref"1.06586)
- Fosfato monosódico dihidratado, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck-Ref" 1.06586)
- Carbón activo (Sigma-Ref" C-5385)
- Dextrano (Sigma-Ref" D-4751)
- Éter dietílico (Merck-Ref"1.00921)
- EcoLite TM (MP (ICN) Cat. # 882475 cintilante)
- Estándar 17,20 β -P (Steraloids, Q-1850)

Preparación de stock Tampón Fosfato (**Anexo 1**).

Preparación del stock Tampón Gelatina (**Anexo 2**).

IV.3.4.3. Anticuerpos y Marcadores

El anticuerpo específico, anti-17,20 β -P y el marcador específico, 17,20 β -P-3H, se prepararon siguiendo la metodología de Scott *et al.*, 1982. Los anticuerpos (anti-II Ketotestosterona, anti-Estradiol y anti-17,20 β -P) y marcadores radioactivos fueron donados por el Dr. Adelino Canario de la Universidad de Algarve.

IV.3.4.4. Extracción y cromatografía

a).- Protocolo Extracción con éter (**anexo 3**).

b).- Cromatografía de capa fina (TLC) (**anexo 4**).

La cuantificación de los esteroides (libres y conjugados) del plasma de la sardina del Pacífico se realizó siguiendo la metodología descrita por Canario y Scott (1990). Todas las eluciones (150 μ l de plasma) de las fracciones de TLC fueron diluidas en 750 μ l de tampón gelatina. Alícuotas de 100 μ l de esta disolución fueron adicionadas por duplicado a tubos para RIA.

Se llevaron a cabo los siguientes radioinmunoensayos:

- (i) 17,20 β -P y 11-Ketotestosterona (Scott *et al.*, 1982 y 1984).
- (ii) 17,20 β -21P (Canario *et al.*, 1989).
- (iii) Estradiol (Canario y Scott, 1990).

IV.4. Análisis estadístico

Para definir la naturaleza del análisis estadístico que se aplicó, primero se realizaron pruebas de homogeneidad de varianzas (prueba de Lavene) y distribución normal (prueba de Shapiro-Wilk) (Zar, 1984). A los datos que no cumplieron estas premisas, se les aplicó una transformación, con la finalidad de normalizarlos.

Para el factor de condición, se realizó una transformación de Arcoseno, como no cumplió con los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad, se aplicó un análisis no paramétrico ANOVA por rangos de Kruskal-Wallis.

En el experimento de inducción al desove se aplicó un ANOVA-1 para evaluar las diferencias en el grado de atresia folicular de los ovocitos entre las concentraciones de hormona y el grupo control, con un nivel de significación de 0.05.

V. RESULTADOS

Para la realización de este estudio se utilizaron muestras de gónadas de las diferentes etapas de los muestreos, de la colecta de sardinas (Junio-Agosto de 2007), del acondicionamiento bajo un régimen natural del fotoperiodo y la temperatura (Junio del 2007 a Marzo de 2008) y del acondicionamiento con un régimen artificial del fotoperiodo y la temperatura (Mayo a Octubre del 2008), y se elaboró la escala de madurez gonadal.

V.1. Maduración gonadal

V.1.1. Análisis macro y microscópico

La distribución de las frecuencias de los diámetros de los ovocitos, representan la secuencia de su desarrollo en las gónadas, esto permitió separar en intervalos de clases e identificar diferentes fases de desarrollo: de $< 200 \mu$, 220 a 669μ , y $> 700\mu$ (**Tabla. III**).

La composición de los diámetros de los ovocitos observada en las gónadas de *S. sagax caeruleus*, indica un patrón particular de desovadores parciales, que se caracterizan por la presencia de ovocitos en diferente grado de maduración en una misma temporada de desove, conforme los ovocitos culminan el proceso de maduración son liberados por grupos en desoves múltiples. Esto se evidencia a través de la distribución de las frecuencias de los diámetros de los ovocitos, donde se puede apreciar una distribución multimodal.

El análisis histológico permitió identificar distintas fases del desarrollo de los ovocitos, que correspondieron a las diferentes modas (**Fig. 3**). Los ovocitos perinucleolares "Pn" ($50 - 200 \mu$) fueron los mas frecuentes en la mayoría de las gónadas analizadas, formando parte del stock permanente de ovocitos y se caracterizan por que carecen de vitelo y la razón diámetro nuclear/diámetro ovocito es menor a $10 \mu\text{m}$. Ovocitos previtelogenicos "Pv" ($200-300 \mu$), se observan las vesículas de vitelo y se puede apreciar el ensanchamiento de la

membrana exterior del ovocito (folículo), en este estadio comienza a ser visible el alvéolo cortical. Cabe destacar que a partir de este estadio de desarrollo (300 μ) se construyeron las distribuciones de frecuencia para la sardina del Pacífico, ya que al parecer la formación del alvéolo cortical es el primer proceso verdaderamente dependiente de la GTH I y no antes, y por la dificultad de contar tantas células tan pequeñas que además no serían indicadoras del momento idóneo para la inducción.

En el intervalo de diámetros comprendido entre los 300 y 500 μ m se encuentran los ovocitos en una etapa temprana de la vitelogénesis o en maduración "V". Los ovocitos con diámetros entre 500 y 800 se caracterizan por un incremento gradual en el número de gránulos de vitelo que se distribuyen entre el núcleo y la zona radiata, a medida que avanza el proceso vitelogénico, los gránulos se fusionan y se convierten en glóbulos.

Una vez culminada la vitelogénesis, da inicio el proceso de maduración final, que incluye el proceso de hidratación, este se considera una categoría aparte, por ser la fase final de maduración y por ser la que menor tiempo dura (horas). En esta fase, hay un incremento sustancial en el volumen a causa de la toma de agua, el núcleo se ha disuelto y los gránulos lipídicos se unen para formar una única gota, en este momento el diámetro de los ovocitos es superior a las 700 μ m. Se presume que la ovulación y desove ocurriría en un lapso de 24 horas, tal como ocurre en otras especies similares, en este estudio no se pudieron observar en ningún caso estas características, por lo que no se consideraron en la escala de maduración.

En la sardina del Pacífico *S. sagax caeruleus*, los testículos son órganos pareados, de forma alargada y de tipo lobular, están dispuestos en la pared dorsal de la cavidad abdominal. Estructuralmente, cada testículo está compuesto por un gran número de lóbulos de un diámetro muy pequeño, en cuyo interior se pueden observar en la periferia de cada lóbulo grupos de células espermáticas, cada grupo se encuentra en un estado de desarrollo

diferente a lo largo de sus paredes y están rodeadas por células de Sertoli. Cada lóbulo está provisto de un lumen central que se conecta con el sistema de conductos deferentes, a través del cual los espermatozoides maduros son expulsados. El desarrollo testicular tiene lugar en estos lóbulos donde se encuentran las espermatogonias (precursoras de la estirpe germinal), que después de dividirse mitóticamente pasan por diferentes estadios de desarrollo: espermocitos primarios, secundarios y espermátides, antes de que ocurra la espermiogénesis, que consiste en la transformación de las espermátidas (eliminación del citoplasma celular y desarrollo del flagelo) en espermatozoides (células maduras preparándose para la fecundación). Entre lóbulo y lóbulo se encuentra el espacio intersticial que contiene sangre y vasos linfáticos, fibroblastos y células de Leydig. Finalmente después de la espermiogénesis o producción de espermatozoides los testículos entran en regresión gonadal (**Fig. 4**).

Para la construcción de la escala de maduración gonadal de las hembras y los machos, se definieron cuatro estadios (**Tabla III y IV, Fig. 5, 6 y 7** respectivamente). Para la escala de desarrollo ovárico se tomaron en consideración las escalas y los criterios de Clark (1931) y Plaza *et al.* (2002). El desarrollo testicular se clasificó tomando en cuenta como criterio las características de las células germinales.

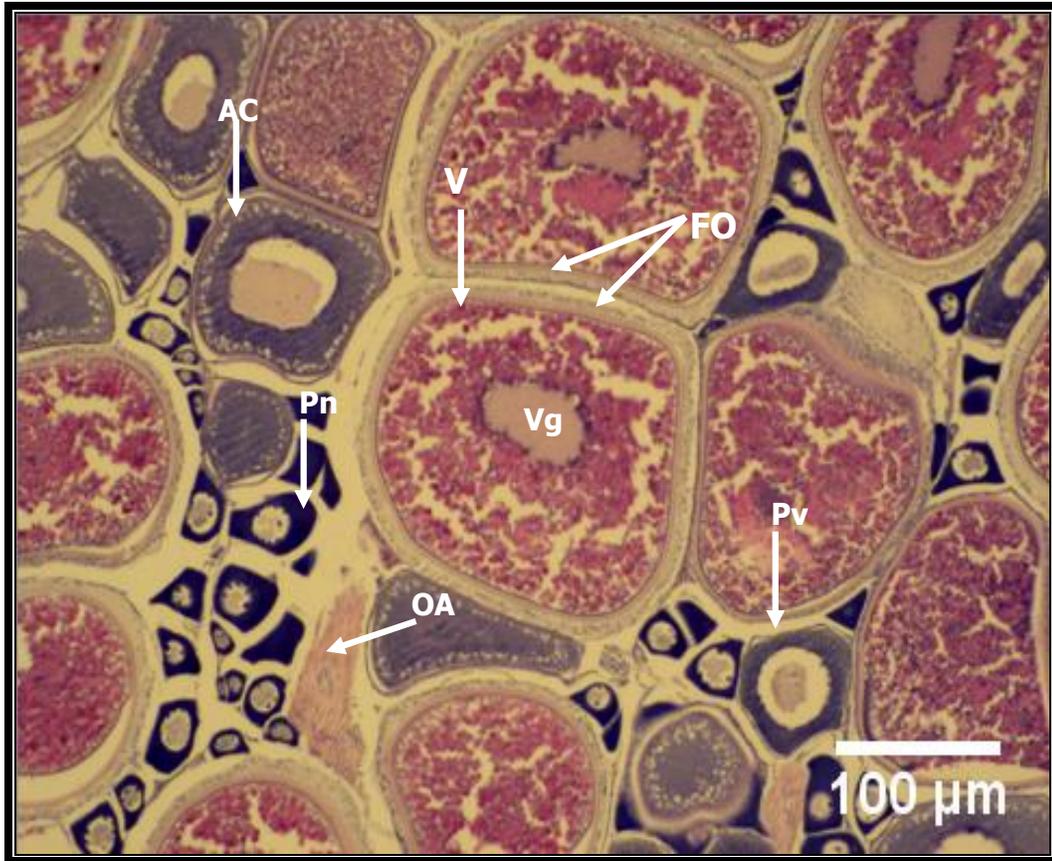


Figura 3. Fotografía histológica que muestra el desarrollo gonadal en las hembras de la sardina del Pacífico *S. sagax caeruleus*. 200X. Fijador Bouin. Tinción H&E. Vg: Vesícula germinal, Pn: Ovocito perinucleolar, Pv: Ovocito previtelogénico, AC: etapa Alvéolo cortical, comienza la endovitelogenesis, V: Ovocito vitelado, OA: Ovocito Atrésico y FO: Folículo Ovárico.

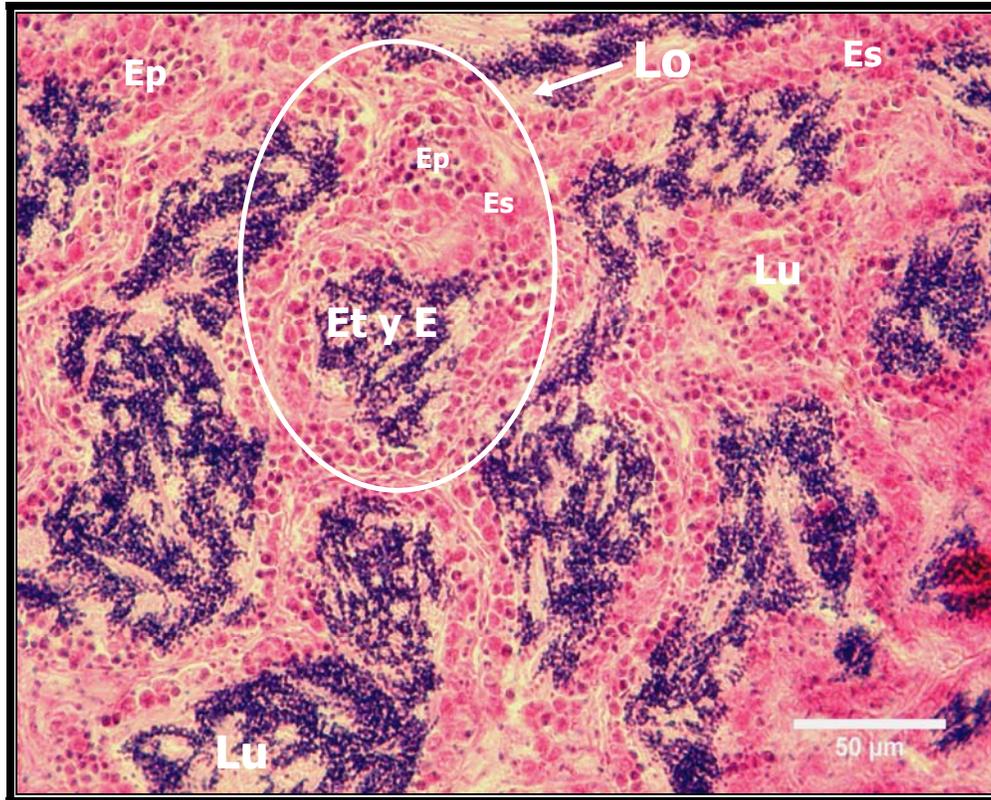


Figura 4. Fotografía histológica de un testículo de la sardina del Pacífico *S. sagax caeruleus* en maduración. 400X. Fijador Davison, Tinción H&E. Lo: Lóbulo, Lu: Lumen, Es: Espermatogonias, Ep: Espermatocitos primarios y secundarios (se tiñen de un color rosa), Et: Espermátidas y E: Espermatozoides (se tiñen de color morado-azul).

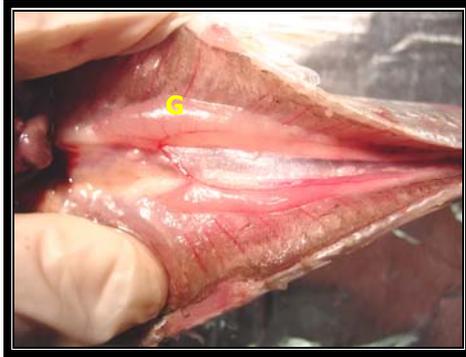
Tabla III. Escala de maduración gonadal para las hembras de la sardina del Pacífico que se distribuye en la costa oeste de Baja California.

ESTADIO	DIÁMETRO (μ)	DESCRIPCIÓN	
		Macroscópica	Microscópica
I. INMADURA	< 200	Ovarios pequeños, ocupan del 10 al 20 % de la cavidad abdominal. Su peso equivale al 0.82% del peso de la carcasa del pez. Son alargados y hialinos, solo se diferencian al microscopio (Fig. 5-A y 6-A).	En este estadio se observan numerosos ovocitos previtelogénicos, distribuidos uniformemente en las lámelas que se proyectan desde la túnica albugínea hacia el interior del ovario. Se observan ovocitos en la fase perinucleolar, los nucléolos son numerosos y se disponen en la periferia del núcleo. También da inicio la formación de la cubierta folicular (Fig. 7-A).
II. EN MADURACIÓN (Ovocito opaco)	220-699	Ovarios translúcidos de color rosado o rojizo, ocupan del 45 al 50 % de la cavidad abdominal, su peso equivale al 1.97% del peso de la carcasa del pez. Los ovocitos son invisibles a simple vista (Fig. 5-B y 6-B).	En esta etapa se observan folículos perfectamente definidos y esféricos, los ovocitos están parcialmente vitelados y la vesícula germinal en el centro de la célula, en esta fase el alvéolo cortical comienza a acumularse en el citoplasma, después se dispone en la periferia del ovocito, también se observan inclusiones lipídicas. Al finalizar este estadio se observan ovocitos completamente vitelados, con numerosos glóbulos de vitelo (Fig. 7-B).

<p>III. MADURA <i>(Ovocito transparente)</i></p>	<p>700 en adelante</p>	<p>En el caso de hembras recién capturadas en el mar, los ovarios tienen un color anaranjado-rojizo, las hembras mantenidas en cautiverio presentan una coloración translúcida; el peso de las gónadas varía en un intervalo más amplio, que va del 2 al 9 % del peso de la carcasa del pez, los ovarios ocupan casi la totalidad de la cavidad abdominal. La túnica albugínea es transparente, firme y está profusamente vascularizada (Fig. 5-C y 6-C).</p>	<p>Los Ovocitos se observan a simple vista, su color va de amarillo a anaranjado, son menos esféricos, ya que pueden presentar formas irregulares con varias caras planas. El citoplasma tiene una apariencia homogénea, se observan numerosos glóbulos de aceite. El núcleo se observa en una posición excéntrica, que puede variar entre la región central de la célula y la periferia (Fig. 7-C y C1).</p>
<p>IV. EN REABSORCIÓN</p>	<p>Alrededor de 200</p>	<p>Ovarios flácidos, color amarillo oscuro o marrón, el proceso de reabsorción puede observarse en todos los estadios de maduración (Fig. 5D).</p>	<p>En este estadio, las gónadas se encuentran parcialmente en estado de reabsorción con alrededor del 40 % de folículos atrésicos (Fig. 7-D y D1).</p>

Tabla IV. Escala de maduración gonadal para los machos de la sardina del Pacífico que se distribuye en la costa oeste de Baja California.

ESTADIO	DESCRIPCIÓN	
	Macroscópica	Microscópica
I. INMADURO (Gónada traslucida)	Testículos pequeños, su peso equivale alrededor del 0.77 % del peso de la carcasa del pez. Son alargados y transparentes (Fig. 5-E y 6-A).	El desarrollo comienza con la proliferación celular, espermatogonias (Fig. 8-A)
II. EN MADURACIÓN	Testículos alargados y de color cremoso, su peso equivale al 1.5 % del peso de la carcasa del pez. Ocupan la mitad de la cavidad abdominal del pez (Fig. 5-F y 6-B).	Este estadio se caracteriza porque se encuentran espermátocitos y espermátidas y espermatozoides llenando el lumen (que se encuentra conectado al sistema del conducto deferente) (Fig. 8-B).
III. MADURO (Gónada oscura)	Testículos grandes blancos cremosos y aplanados, su peso equivale alrededor del 2 % con relación al peso de la carcasa del pez. Su longitud es casi igual a la longitud total de la cavidad abdominal (Fig. 5-G y 6-C).	En el lumen testicular se observan numerosos espermatozoides y líquido seminal (Fig. 8-C).
IV. EN REABSORCIÓN	Testículos grisáceos y flácidos, a veces con un sistema vascular conspicuo. En este estadio el peso de la gónada puede variar, ya que puede presentarse reabsorción durante todo el desarrollo gonadal (Fig. 5H).	Después de la espermiación, se observan testículos con lumen vacío y en recuperación (absorción por fagocitosis de residuos de espermatozoides) (Fig. 8-D).



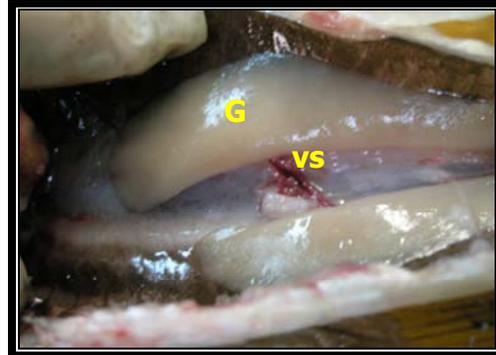
A. Estadio I. Inmadura



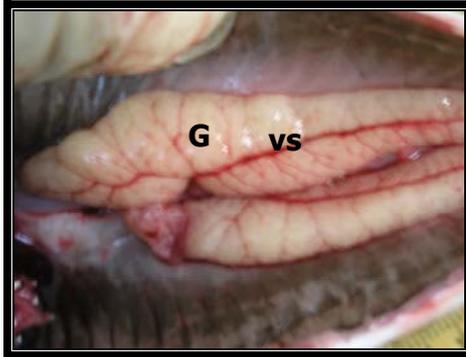
E. Estadio I. Inmaduro



B. Estadio II. En maduración



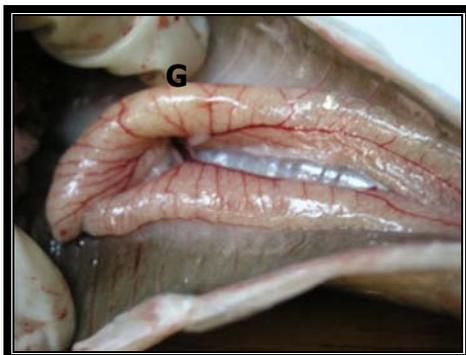
F. Estadio II. En maduración



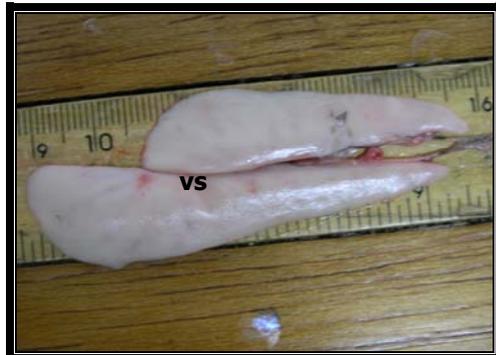
C. Estadio III. Madura



G. Estadio III. Maduro

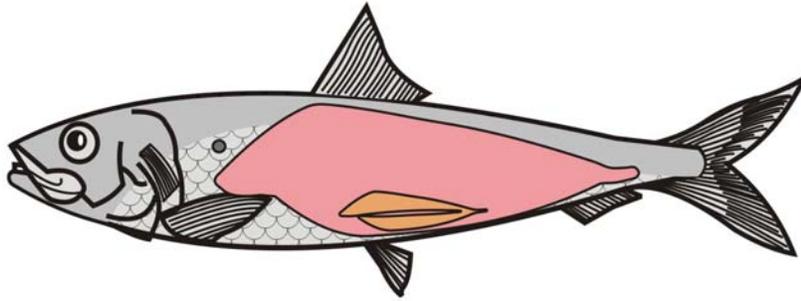


D. Estadio IV. En Reabsorción

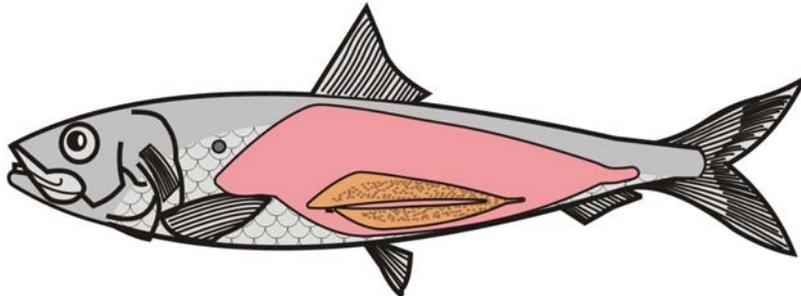


H. Estadio IV. En Reabsorción

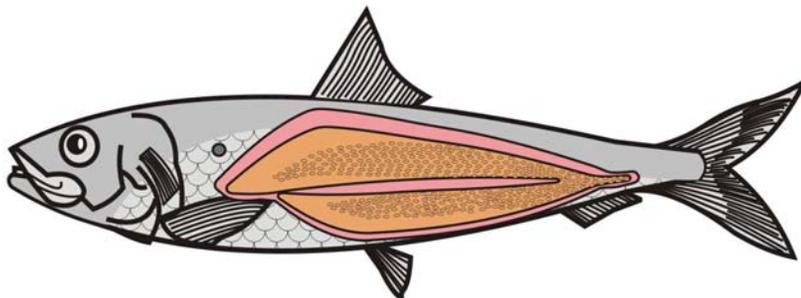
Figura 5. Fotografías que muestran el desarrollo gonadal a nivel macroscópico de la sardina del Pacífico *Sardinops sagax caeruleus*. G: Gónada, vs: vaso sanguíneo.



- A. Inmaduro. Gónada pequeña, su longitud es del 10 al 15 % de la longitud total de la cavidad abdominal.

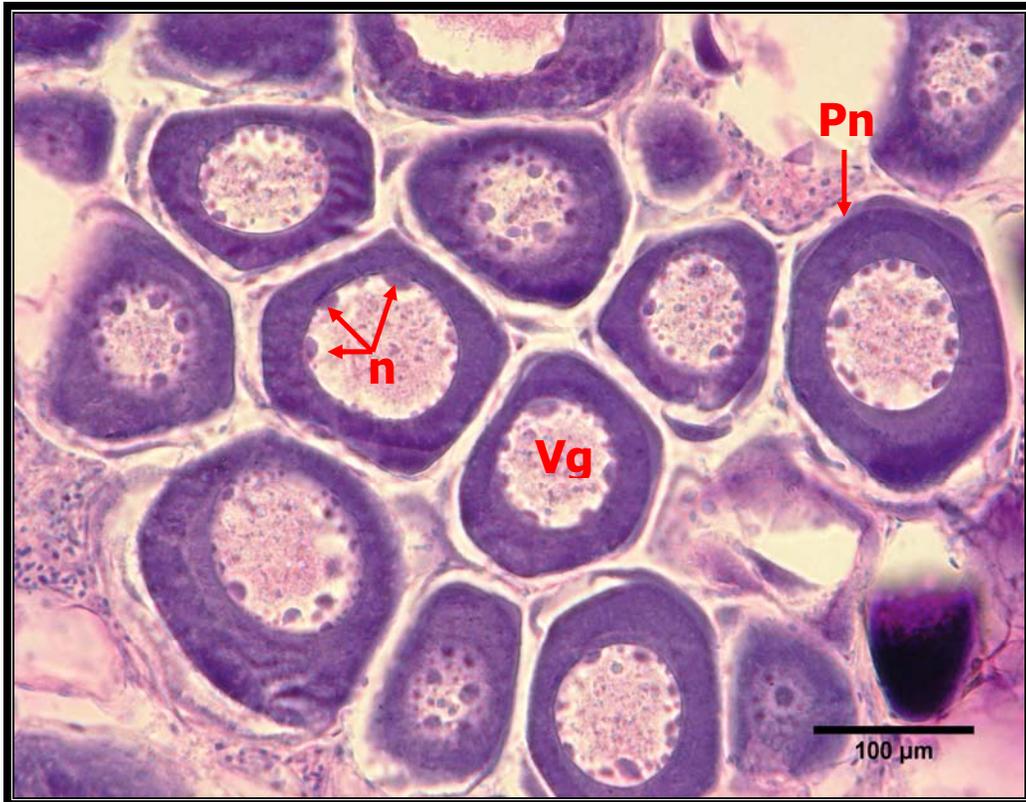


- B. En Maduración. La gónada ocupa del 45 al 50 % del total de la cavidad abdominal.



- C. Maduro. Gónada grande, ocupa casi toda la longitud de la cavidad abdominal (aproximadamente el 95 %).

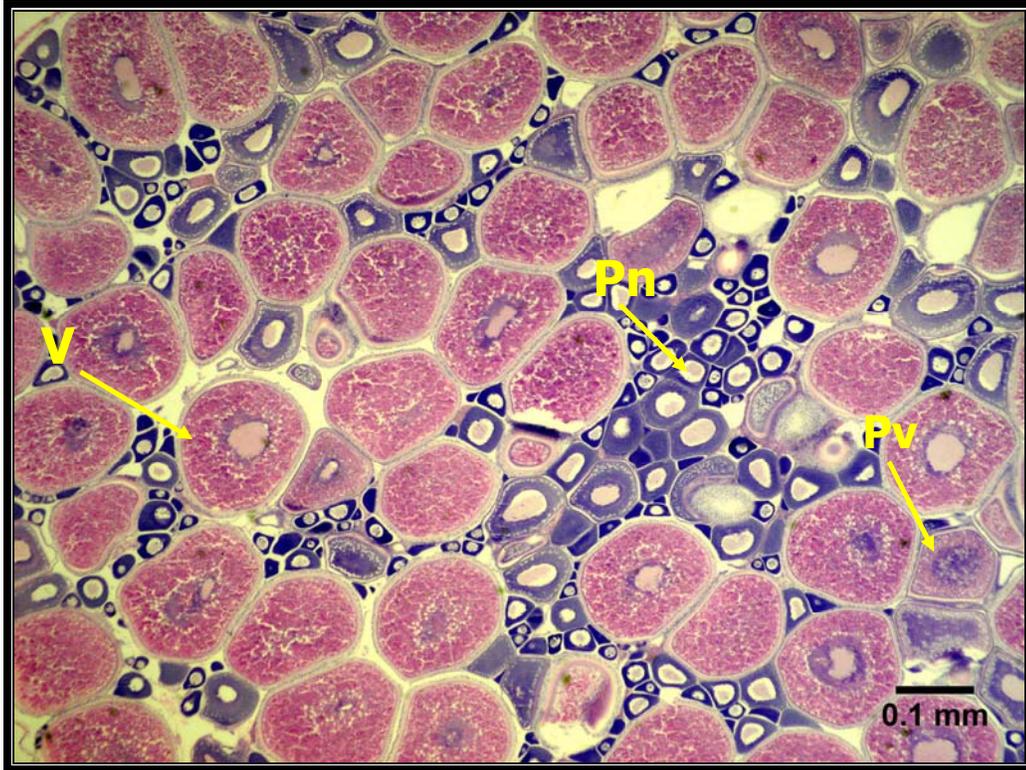
Figura 6. Esquemas de la longitud que ocupa la gónada con relación a la longitud total de la cavidad abdominal de la sardina del Pacífico *sardinops sagax caeruleus* en ambos sexos. Dibujo por Francisco Valenzuela Buriel.



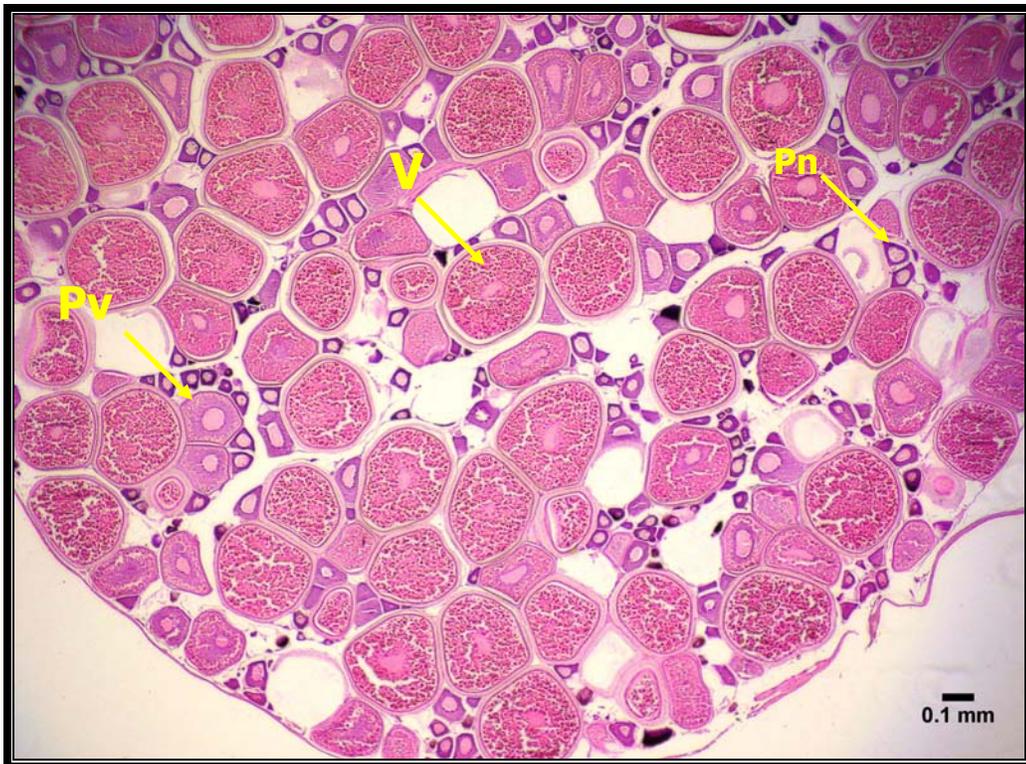
A. Estadio I. Inmadura. 200X. Fijador Bouin, Tinción H&E.



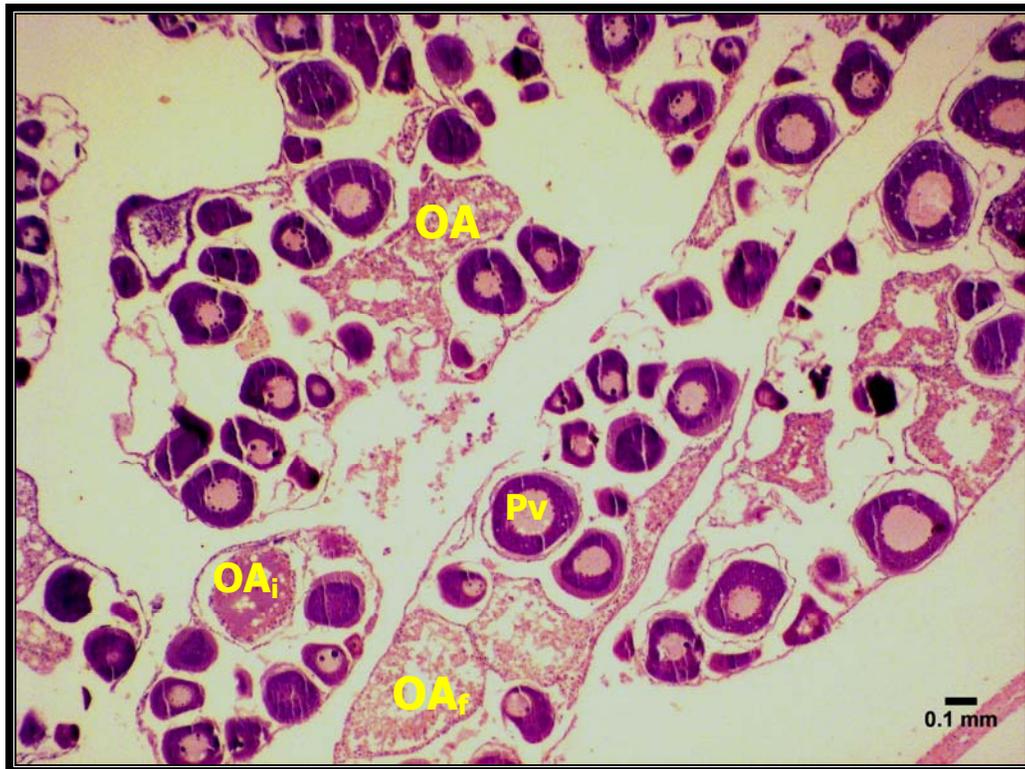
B. Estadio II. En maduración. 100X. Fijador Davison, Tinción H&E.



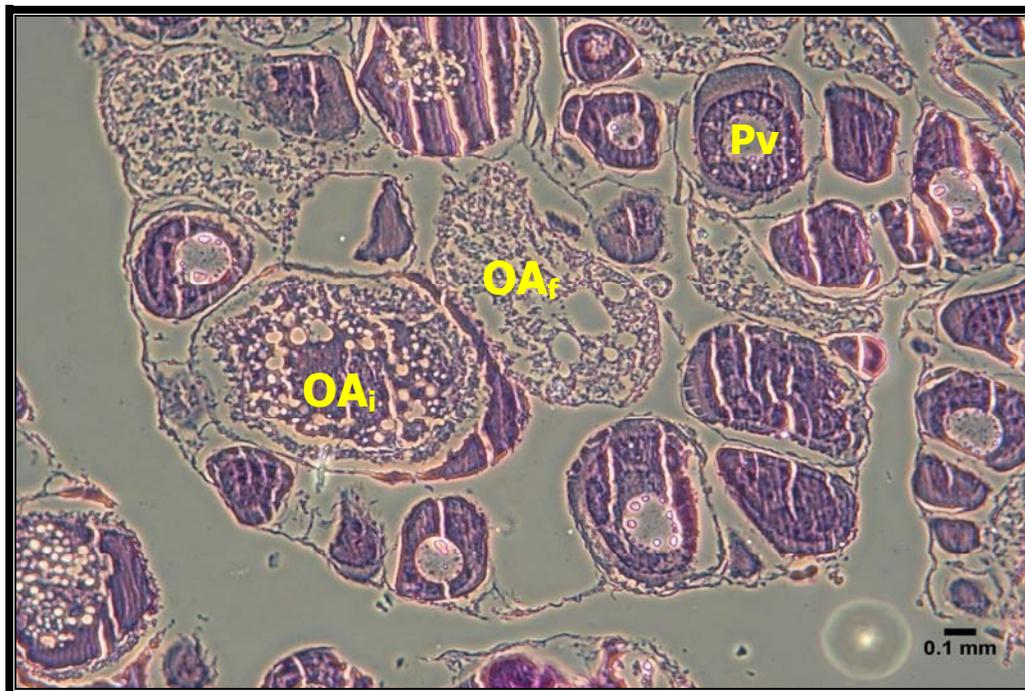
C. Estadio III. Madura. 100X. Fijador Bouin, Tinción H&E.



C1. Estadio III. Madura. 40X. Fijador Davison, Tinción H&E.

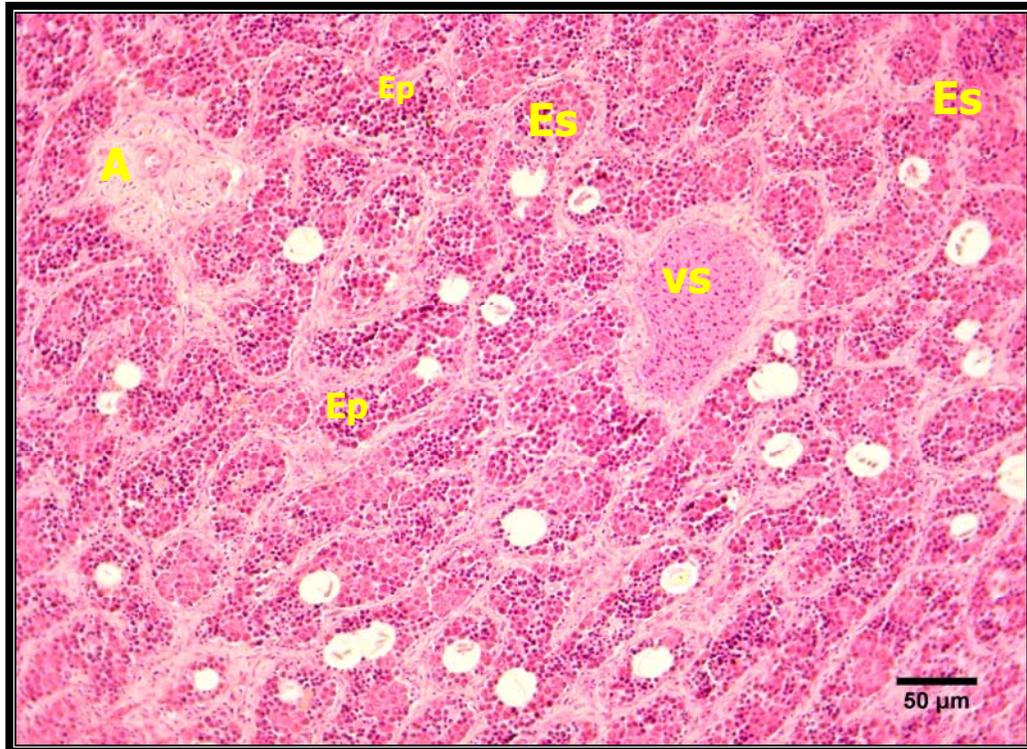


D. Estadio IV. En reabsorción. 40X. Fijador Bouin, Tinción H&E.

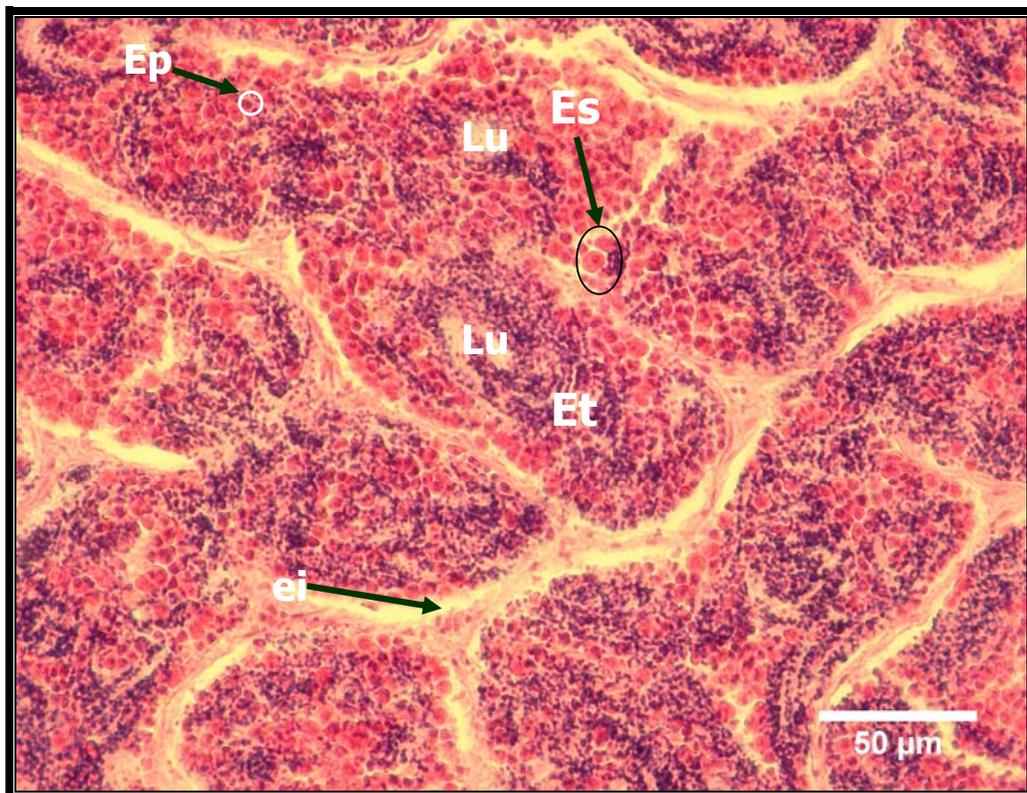


D1. Estadio IV. En reabsorción. 40X. CF, Fijador Bouin, Tinción H&E.

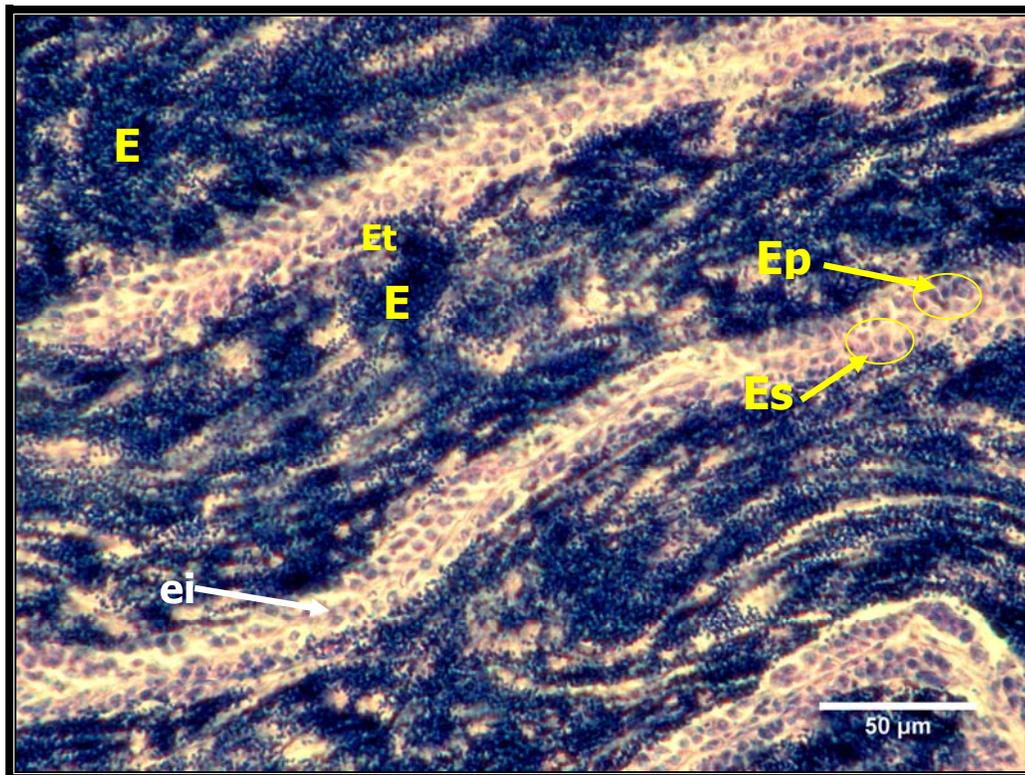
Figura 7. Microfotografías que muestran el desarrollo ovarico de la sardina del Pacífico *Sardinops sagax caeruleus*. A. Estadio I. Inmadura, ovocitos previtelogénicos. B. Estadio II. En maduración, ovocitos en etapa de alvéolo cortical. C y C1. Estadio III. Madura, ovocitos vitelogénicos. Foto D. Estadio IV. En Reabsorción, ovocitos atrésicos y, D1. Contraste de fases, células fagocíticas, OA_i = reabsorción celular inicial y OA_f = reabsorción celular final. L: Lámelas, VG: Vesícula Germinal, n: nucléolo, Pn: Ovocito perinucleolar, Pv: Ovocito previtelogénico. AC: Alvéolo Cortical, V: Ovocito vitelado y OA: ovocito Atrésico.



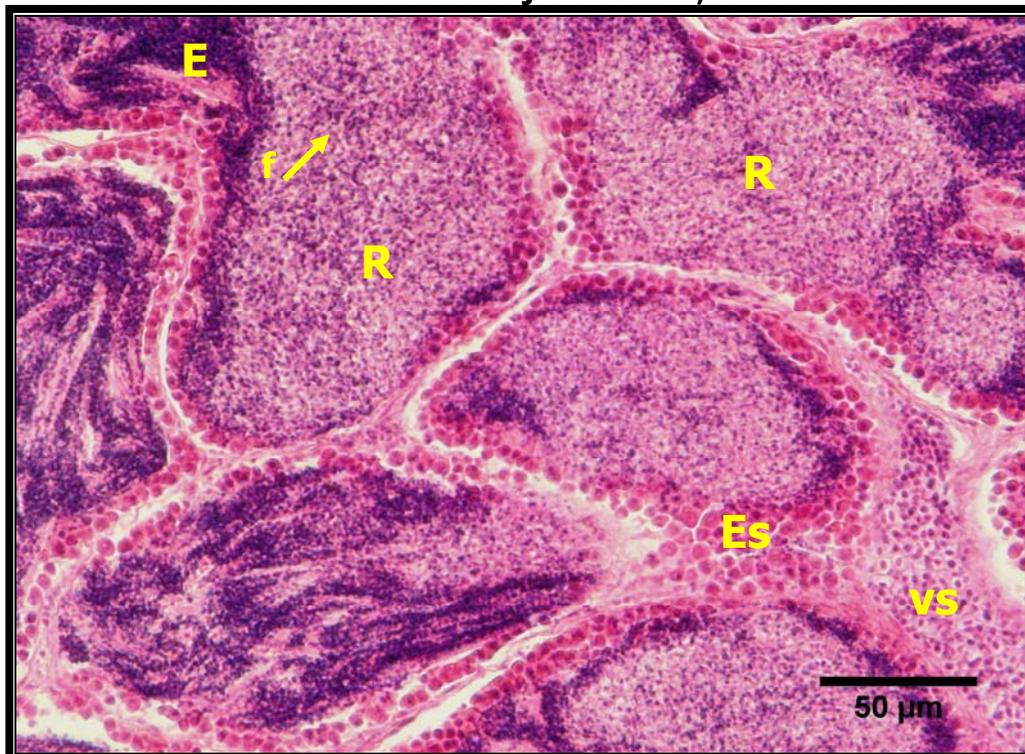
A. Estadio I. Inmaduro. 200X. Fijador Davison, Tinción H&E.



B. Estadio II. En maduración. 400X. Fijador Davison, Tinción H&E.



C. *Estadio III. Maduro.* 400X. Fijador Bouin, Tinción H&E.



D. *Estadio IV. En reabsorción.* 400X. Fijador Davison, Tinción H&E.

Figura 8. Microfotografías que muestran el desarrollo testicular de la sardina del Pacífico *Sardinops sagax caeruleus*. A. Estadio I Inmaduro, se caracteriza por la abundancia de espermatogonias y espermatocitos. B. Estadio II En maduración, se observan espermátides. C. Estadio III Maduro, espermatozoides en el lumen formando oleadas, no se observan lóbulos definidos. D. IV En Reabsorción, Lu: Lumen, ei: espacio intersticial, Es: Espermatogonias, Ep: Espermatocitos, Et: espermátides, E: Espermatozoides, R: Reabsorción y f: células fagocíticas.

V.2. Maduración de *S. sagax caeruleus* con régimen natural de fotoperiodo y temperatura

V.2.1. Acondicionamiento de los organismos

Para el propósito de este trabajo se han utilizado ejemplares adultos de la sardina del Pacífico, con un rango de edad entre 1.5 y 3.5 años, obtenida del análisis de los otolitos, procedentes de la pesca comercial, durante los meses de Junio a Agosto del 2007, donde se registraron las mortalidades más altas (72%). A partir de este periodo se tomó una muestra y se realizaron biometrías (Tabla V).

Tabla V. Peso y longitud total promedio de una muestra de las sardinas del Pacífico, *Sardinops sagax caeruleus*, recolectadas durante los meses Junio-Agosto del 2007 (\pm desviación estándar).

<i>Mes</i>	<i>n</i>	<i>Peso (g)</i>	<i>Longitud total (g)</i>
Junio	28	76.75 \pm 7.90	20.39 \pm 0.60
Julio	20	80.25 \pm 7.60	20.67 \pm 0.88
Agosto	25	76.64 \pm 8.92	21.13 \pm 1.68

V.2.1.1 Parámetros fisicoquímicos

El acondicionamiento reproductivo de la sardina del Pacífico comprendió del mes de Junio de 2007 al mes de Marzo de 2008. Durante este periodo, los parámetros de calidad del agua del sistema de recirculación se controlaron para mantener la salinidad en 34‰, el oxígeno a saturación, entre 6 y 7 mg/l, el pH de 7.9 y 8 y la alcalinidad alrededor de 120 mg/l como CaCO₃, que es la alcalinidad apropiada para los sistemas de recirculación de agua de mar. El nitrógeno amoniacal total (NAT), los nitritos y nitratos se mantuvieron en concentraciones bajas, adecuadas para la salud de los peces. La variación de la

temperatura del agua en los tanques para el periodo experimental fue de 6.4 °C (Tabla VI, Fig. 9).

Tabla VI. Parámetros de calidad del agua del sistema de recirculación para la sardina del Pacífico, *Sardinops sagax caeruleus*, durante el periodo de Junio del 2007 a Marzo del 2008, bajo un régimen natural de fotoperiodo y sin control de temperatura. Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar. NAT, nitrógeno amoniacal total.

<i>Salinidad</i> ‰	<i>OD</i> mg/l	<i>NAT</i> mg/l	<i>NO₂</i> mg/l	<i>NO₃</i> mg/l	<i>pH</i>	<i>Alcalinidad</i> mg/l
33.4 \pm 1.30	6.9 \pm 1.05	0.37 \pm 0.21	0.45 \pm 0.27	9.95 \pm 3.62	7.9 \pm 0.14	117.5 \pm 12.58

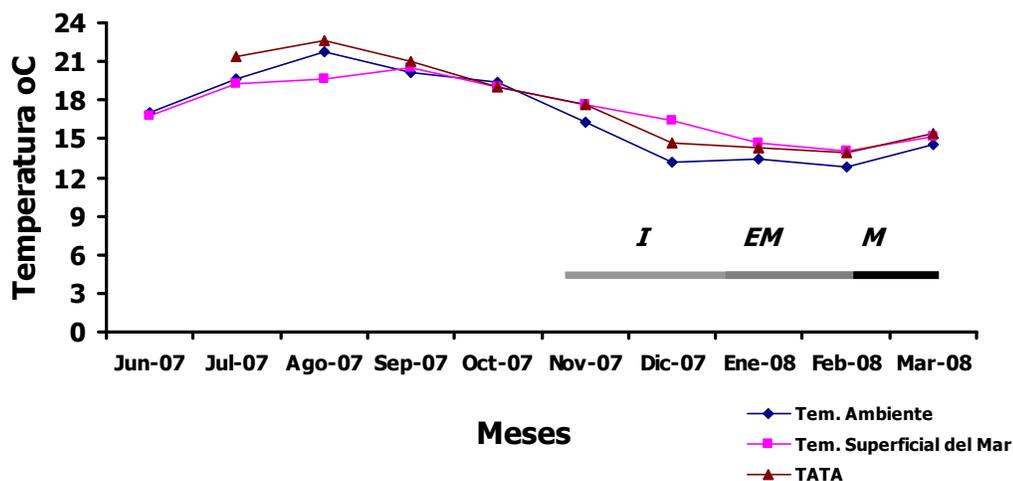


Figura 9. Promedio mensual de la variación de la temperatura registrada durante el periodo de acondicionamiento reproductivo de la sardina del Pacífico *Sardinops sagax caeruleus*, con un régimen natural del ambiente. La barra horizontal muestra el grado de madurez máximo que presentaban los organismos con relación a la temperatura y al momento en que se realizó el diagnóstico de la madurez. I= inmaduros; EM= en maduración y M= maduro, TATA= Temperatura del Agua del Tanque de Acondicionamiento.

V.2.1.2. Factor de condición

Durante los primeros muestreos se observaron los valores más altos del factor de condición, alrededor de uno. En el tercer muestreo para los machos y quinto muestreo en ambos sexos se observó una ligera disminución de F (0.8). Sin embargo, no se observan diferencias significativas entre los muestreos, aunque en los machos se obtuvo una mayor variabilidad en su condición (muestreo 4 que va desde 0.6 a 1) (Fig. 10).

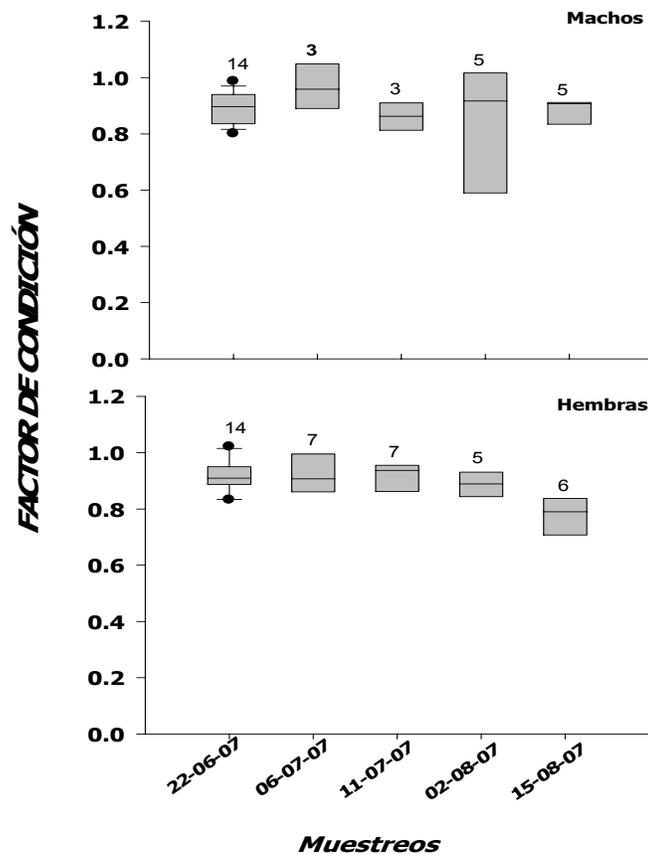


Figura 10. Factor de condición de la sardina del Pacífico, *Sardinops sagax caeruleus* en los cinco muestreos realizados durante el periodo Junio-Agosto de 2007. La línea horizontal dentro de las cajas representa la mediana, los límites superior e inferior incluyen el 50% de los datos, las cotas superior e inferior el 95% de los datos y los círculos negros los valores extremos.

V.2.1.2. Índice gonadosomático

El índice gonadosomático en los machos se incrementó conforme transcurrieron los muestreos. También se observó que en ambos sexos existe una gran variabilidad en el valor del índice para cada uno de los muestreos realizados. La variación del estado reproductivo que se refleja en el índice es más evidente en las hembras, por ejemplo, en el primer muestreo hay organismos con un índice gonadosomático cercano a cero y un organismo con un valor de 9. Sin embargo, el análisis no paramétrico, ANOVA de Kruskal-Wallis indica que no existen diferencias significativas ($X^2=22.13$, $P=0.0002$) para los muestreos en ninguno de los sexos (**Fig.11**).

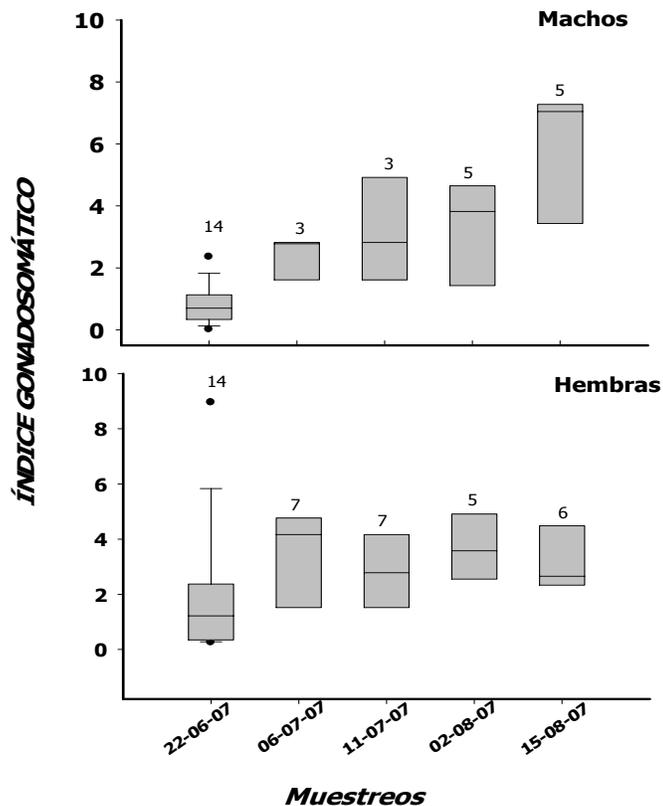


Figura 11. Índice gonadosomático de la sardina del Pacífico, *Sardinops s. caeruleus*, medido durante el periodo de acondicionamiento reproductivo. La línea horizontal dentro de las cajas representa la mediana, los límites superior e inferior incluyen el 50% de los datos, las cotas superior e inferior el 95% de los datos y los círculos negros los valores extremos.

V.2.2. Diagnóstico de la madurez gonadal

Se observó que de Noviembre a Febrero la temperatura descendió de 17 a 14 °C y los organismos pasaron del estadio I (inmaduro) al estadio II (en maduración). Cuando la temperatura se incrementó durante los meses de Febrero a Marzo (14 a 16 °C), los organismos presentaban un mayor grado de madurez gonadal (**Fig. 9**).

Para diagnosticar la maduración gonadal se efectuaron nueve muestreos con un total de 30 organismos, cada organismo se analizó macro y microscópicamente, se registró y documentó por medio de fotografías digitales. Los ovocitos se dividieron en cuatro estadios de acuerdo con el grado de vitelogénesis alcanzado. La **tabla VII** muestra los registros del desarrollo gonadal a través del tiempo, hasta el tercer muestreo tanto las hembras como los machos se encontraban inmaduros, a partir del cuarto muestreo se observó la presencia de hembras en maduración, sus ovocitos tenían un diámetro máximo entre 300 y 400 μm . En el último muestreo realizado en el mes de marzo, las sardinas se encontraban en un estado de madurez adecuado para la inducción, ya que en las hembras, los ovarios ocupaban toda la cavidad abdominal, presentaban un color amarillo-anaranjado y los ovocitos tenían un diámetro de 520 a 750 μm (**Fig. 12**). En el caso de los machos, se observó que los testículos ocupaban toda la longitud de la cavidad abdominal y tenían un color crema. Se procedió a realizar la primera inducción al desove.

Tabla VII. Diagnóstico del estado de madurez sexual de las gónadas de *Sardinops sagax caeruleus*. IGS: Índice gonadosomático.

Muestreo	Organismo	Hembras				Machos			
		Edo. Mad. gonadal			IGS	Edo. Mad. gonadal			IGS
		Inmaduro	En maduración	Maduro		Inmaduro	En maduración	Maduro	
1 (05-11-07)	1					x			0.77
	2	x			0.75				
2 (20-11-07)	1	x			1.02				
	2	x			1.25				
3 (04-12-07)	1					x			0.26
	2					x			0.40
	3					x			0.63
	4					x			0.65
4 (18-12-07)	1	x			1.21				
	2		x		1.10				
	3							x	6.54
	4	x			1.10				
	5	x			0.63				
5 (03-01-08)	1		x		1.94				
	2	x			0.25				
	3		x		1.51				
6 (18-01-08)	1					x			0.55
	2					x			0.66
	3					x			0.37
7 (05-02-08)	1						x		1.74
	2		x		1.45				
	3						x		1.22
8 (24-02-08)	1					x			0.52
	2	x			0.38				
	3					x			0.44
	4		x		0.81				
	5		x		1.74				
9 (12-03-08)	1			x					
	2		x		2.08				
	3						x		1.98

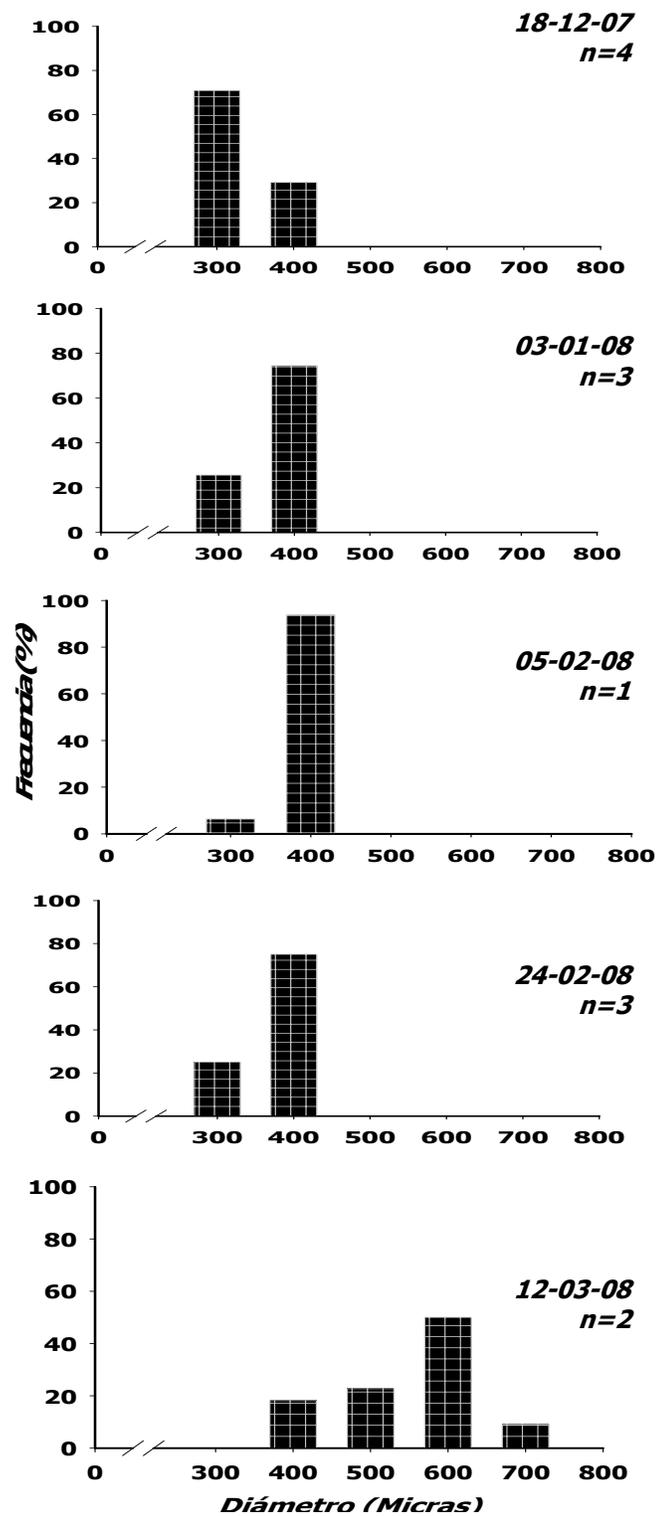


Figura 12. Frecuencia relativa promedio de los diámetros de los ovocitos de la sardina del Pacífico, *Sardinops sagax caeruleus*, durante los meses de Diciembre del 2007 a Marzo del 2008.

V.2.3. Inducción hormonal con GnRHa

La inducción al desove se realizó con el análogo de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRHa). La muestra de sardinas consistió de 15 hembras con un peso de 95.04 ± 3.69 g y una longitud total de 21.54 ± 0.26 cm y 21 machos con un peso de 87.96 ± 7.34 g y una longitud total de 27.99 ± 6.14 cm. La hormona se suministró en dos dosis (**Tabla 1**) por medio de una inyección intraperitoneal a las sardinas previamente anestesiadas. Se colocaron en un estanque de desove a una temperatura promedio de 19.93 ± 0.49 °C, una salinidad de 33.7 ± 0.1 ‰ y una concentración de oxígeno disuelto de 5.27 ± 0.36 mg/l.

Después de un periodo de 72 horas contadas a partir de la segunda dosis, los organismos no desovaron, por lo que se realizó un análisis macro y microscópico de sus gónadas, con la finalidad de indagar la causa de este resultado. En la **tabla VIII** se presenta un resumen de los resultados obtenidos para hembras y machos, donde se encontró que la mayoría de los organismos estaban inmaduros (39%) y, en maduración (44%) con un índice gonadosomático (IGS) menor a dos. Del total de los organismos muestreados solo tres hembras y tres machos (17%) se encontraban en maduración con un IGS mayor a dos. La condición que se registró en los organismos fue similar, con un factor de 0.7 a 1.1 y la prueba ANOVA de Kruskal-Wallis reveló que no existían diferencias significativas entre los tratamientos y el grupo control ($X^2 = 8.00$, $P > 0.05$), aunque en el segundo tratamiento se observa menor variación en el factor de condición (**Fig. 13**).

Con respecto al diámetro de los ovocitos, el grupo de la dosis más alta en la primera inyección ($20\text{-}5 \mu\text{g}$ de GnRHa kg^{-1}) presentó el mayor grado de madurez, ya que se observaron ovocitos vitelados con diámetros máximos entre 600 y 700 μm en una frecuencia relativa de 3%, menor que la de los previtelogénicos (75%) con diámetros de 300 μm . Entre el grupo control y el

tratamiento I las frecuencias de los ovocitos con diámetros entre 300 y 500 μm fueron similares, sin embargo, para el grupo sin inyección, la frecuencia de ovocitos en maduración, con diámetros de 500 μm fue mayor (10%) que el tratamiento I (2%), aunque en este último, el diámetro máximo encontrado fue de 600 μm (**Fig. 14**).

Tabla VIII. Análisis de las gónadas de la sardina del Pacífico, *Sardinops sagax caeruleus* después de la inducción con GnRH α . IGS: Índice gonadosomático.

Tratamiento	Organismo	Sexo		Estadio de maduración			IGS
		Hembra	Macho	Inmaduro	En maduración	Maduro	
Control S/I							
R-1	1		x	x			0.46
	2	x			x		1.23
	3	x			x		1.19
	4	x			x		1.16
	5		x	x			0.63
	6	x			x		1.75
R-2	1		x		x		0.98
	2		x	x			0.36
	3	x		x			0.99
	4	x		x			0.89
	5		x		x		0.51
	6		x	x			0.38
Tratamiento I (5-20 μg de GnRHα kg$^{-1}$)							
R-1	1		x		x		1.19
	2	x			x		1.19
	3	x			x		1.11
	4		x			x	2.42
	5		x		x		0.50
	6	x			x		1.58
R-2	1		x	x			0.26
	2		x	x			0.40
	3		x	x			0.16
	4	x			x		1.27
	5	x				x	4.26
	6	x				x	2.12
Tratamiento II (20-5 μg de GnRHα kg$^{-1}$)							
R-1	1		x	x			0.33
	2		x	x			0.30
	3	x			x		1.19
	4		x	x			0.42
	5		x			x	4.15
	6		x	x			0.72
R-2	1		x	x			0.22
	2		x		x		0.59
	3		x		x		0.96
	4	x			x		1.54
	5		x			x	3.45
	6	x				x	2.20
No. Total Org.	36			39%	44%	17%	

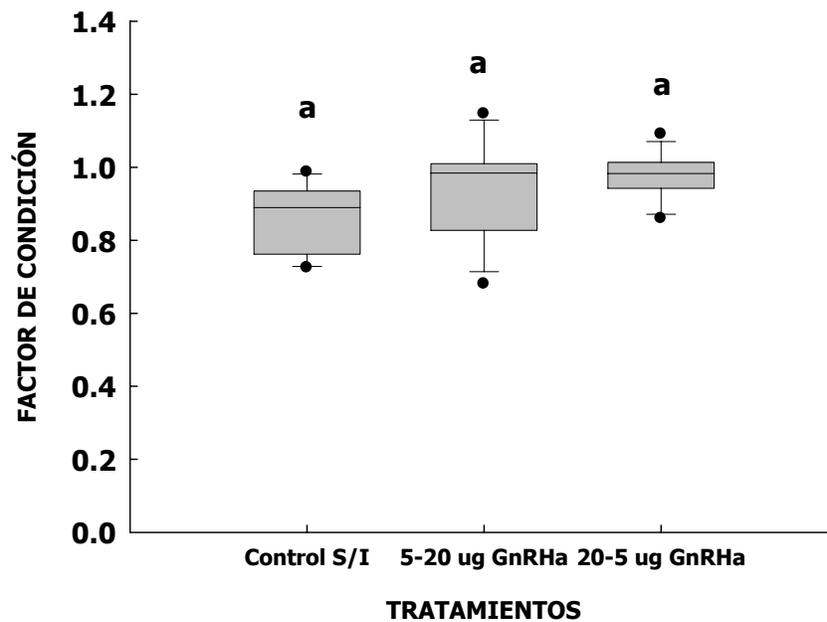


Figura 13. Factor de condición de la sardina del Pacífico, *Sardinops sagax caeruleus*, calculado antes de la inducción al desove. Las letras iguales arriba de la barra indican que no existen diferencia significativa entre los tratamientos ($X^2 = 8.00$, $P > 0.05$). La línea horizontal dentro de las cajas representa la mediana, los límites superior e inferior incluyen el 50% de los datos, las cotas superior e inferior el 95% de los datos y los círculos negros los valores extremos.

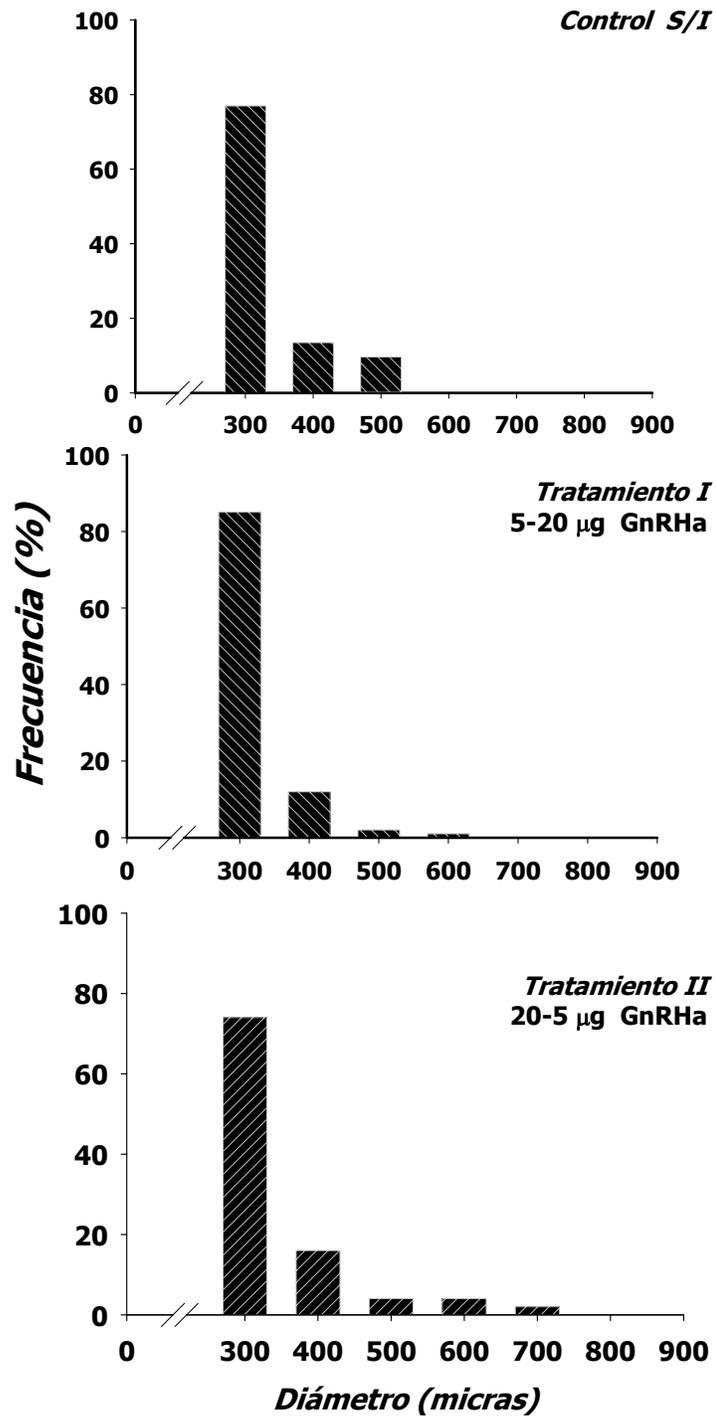


Figura 14. Distribución de frecuencias del diámetro de los ovocitos de la sardina del Pacífico, *Sardinops sagax caeruleus* expuesta a diferentes dosis de GnRHα.

En todos los ovarios analizados se observaron ovocitos atrésicos. Para cuantificar el grado de reabsorción de los ovocitos (atresias), se contabilizó el número de folículos atrésicos en función del total de los folículos contables en un número equivalente de campos (30), con un microscopio compuesto con aumentos de 200X. El porcentaje promedio para cada tratamiento fue del 33 % para el grupo control, 42 % para el tratamiento I y del 53 % para el tratamiento II, siendo este el mayor número de folículos atrésicos con respecto al número de folículos contados para cada gónada. ANOVA de una vía indicó que no existían diferencias estadísticamente significativas ($P>0.05$ y $F=3.0$) entre el número de folículos atrésicos. Sin embargo, entre los tratamientos el mayor número de atresias se cuantificó en los organismos que recibieron la dosis más alta (**Fig. 15**).

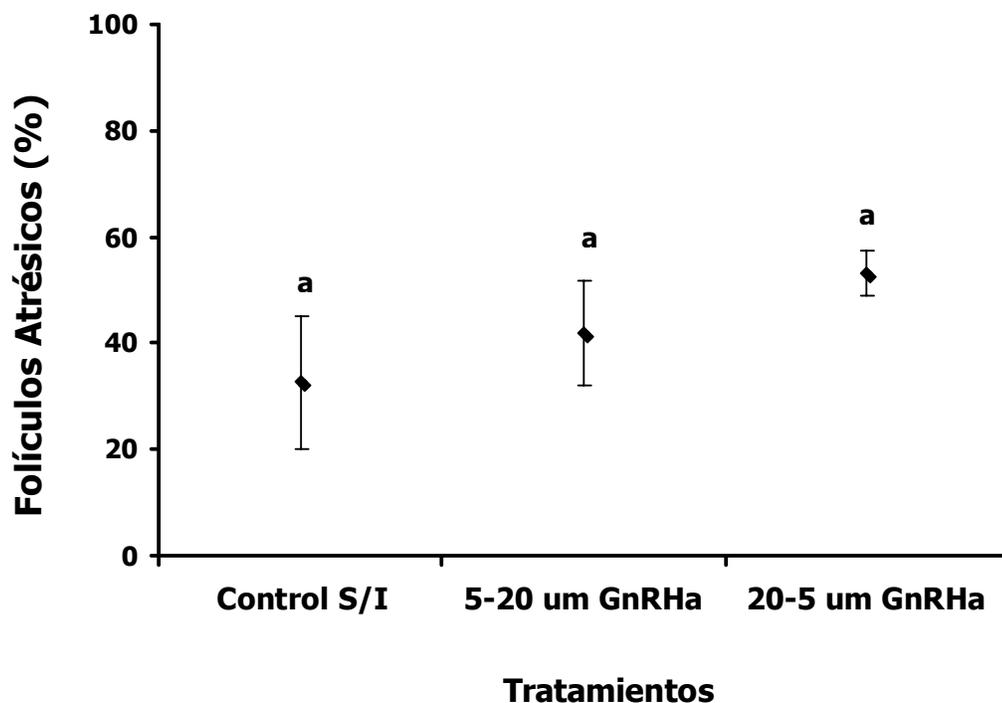


Figura 15. Promedio del porcentaje de folículos atrésicos en los ovarios de la sardina del Pacífico, *Sardinops sagax caeruleus* observados después de la inducción con GnRHα. Las letras iguales arriba de la barra indican que no hay diferencia significativa ($P>0.05$, $F=3.0$). Media \pm desviación estándar.

V.3. Maduración de *S. sagax caeruleus* bajo un régimen artificial de fotoperiodo y temperatura

En respuesta a la ineficacia de la inducción al desove para las sardinas que se mantuvieron bajo condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura, las sardinas se expusieron a un ciclo de luz y temperatura controlados con el cual fue posible restablecer el proceso de maduración gonadal.

V.3.1. Acondicionamiento de los organismos

A partir de los resultados negativos de la inducción al desove, los organismos que se mantenían en proceso de acondicionamiento reproductivo bajo condiciones naturales y que no fueron incluidos en los bioensayos de inducción se expusieron a condiciones controladas de fotoperiodo y temperatura para propiciar la maduración sexual, con este propósito, la dieta se suministró con un suplemento alimenticio compuesto por un alto contenido en proteína (62%), lípidos (16%), fosfolípidos (4%), HUFA (35 mg/g DG) y las vitaminas A (25000 IU/Kg), D3 5000 IU/Kg), E (800 mg/Kg), C (5000 mg/Kg), B1 (65 mg/Kg) y principalmente B2 (85 mg/Kg), para mejorar su estado nutricional y promover la maduración de sus gónadas.

V.3.1.1. Parámetros fisicoquímicos

La calidad del agua del sistema de recirculación se mantuvo controlada adecuadamente, por lo que los parámetros fisicoquímicos fueron adecuados (**Tabla IX**). La temperatura varió de acuerdo a la fase experimental de 18 a 13 °C.

Tabla IX. Parámetros de calidad del agua del sistema de recirculación para la sardina del Pacífico *Sardinops sagax caeruleus*, durante el periodo de Julio a Octubre del 2008, bajo un régimen controlado de fotoperiodo y temperatura. Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar. NAT, nitrógeno amoniacal total.

<i>Salinidad</i> ‰	<i>OD</i> mg/l	<i>NAT</i> mg/l	<i>NO₂</i> mg/l	<i>NO₃</i> mg/l	<i>pH</i>	<i>Alcalinidad</i> mg/l
33.6 \pm 1.36	6.3 \pm 0.5	0.25 \pm 0.001	0.15 \pm 0.07	5.0 \pm 1.6	7.9 \pm 0.12	120

V.3.2. Diagnóstico de la maduración gonadal

Durante el periodo que comprendió del 14 de Julio al 29 de Octubre de 2008 se realizaron tres muestreos para diagnosticar la condición (**Tabla X**) y el estado de maduración de los organismos.

Tabla X. Longitud y peso promedio de la sardina del pacífico *Sardinops sagax caeruleus* expuesta a condiciones controladas de luz y temperatura durante el periodo de Julio a Octubre del 2008.

<i>Muestreo</i>	<i>Medida</i>	<i>n</i>	<i>Media</i>	<i>EE</i>	<i>Moda</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>
1	LT	10	22.13	2.90	--	19	24
	P		89.60	6.56	--	81	110
2	LT	36	22.32	0.17	22	20	24
	P		101.72	24.80	-	47	156
3	LT	22	22.41	6.96	22	20.5	24
	P		97.68	25.96	55	55	156

n=número de organismos; EE=Error Estándar; Min=Mínimo; Max=Máximo; LT=Longitud Total (cm); P=Peso (g).

Primer muestreo 14 de Julio de 2008:

Para establecer la condición inicial de la madurez de las gónadas, antes del control del fotoperiodo y la temperatura, se analizó una muestra de 10 sardinas

entre hembras y machos con una proporción 1:1, en los cuales no se observó un avance en el desarrollo gonadal ya que el 80% de los organismos se encontraron inmaduros y el 20 % iniciando la maduración gonadal, con diámetro máximo de los ovocitos de 400 μm (**16-A**).

Segundo muestreo ocho de Agosto del 2008:

Se analizaron 18 hembras y 18 machos, del total de los organismos el 53 % fueron organismos en maduración y el 47 % inmaduros con un IGS < 2 (**Fig. 19**). En los ovarios analizados se encontró una proporción menor de ovocitos con un diámetro máximo de 550 μm , los ovocitos previtelogénicos (200 - 300 μ) fueron los más frecuentes (**Fig. 16-B y 17-A**). En los testículos se observaron espermatogonias hasta espermátides. En este muestreo se observó que todos los organismos presentaban una gran acumulación de grasa (energía) en la cavidad abdominal, una condición propia de la maduración sexual de los peces, lo que significa que las sardinas se están preparando para la reproducción. Sin embargo, los ovocitos no habían culminado el proceso de la vitelogénesis, por lo que no se encontraban en la condición adecuada para realizar la inducción al desove.

Tercer muestreo, 28 de Septiembre de 2008:

Se analizaron muestras ováricas (n=13) y testiculares (n=8) para este muestreo, de los cuales el 77% entre hembras y machos se encontraban en el estadio III con un IGS mayor a 3. El 23 % de los organismos restantes se encontraban en el estadio II, con un IGS menor a 2 (**Fig. 19**). Cabe mencionar que todos los organismos presentaban un alto contenido de grasa corporal. En la figura **17-B** se observan ovocitos con un diámetro máximo de 700 μm , en una frecuencia muy baja del 1.5 % y de 600 μm (6 %), los cuales son ovocitos que se encontraban culminando la vitelogénesis, la vesícula germinal mas pequeña con relación al citoplasma y folículo ovárico evidente. Sin embargo los ovocitos con mayor frecuencia fueron los de 440-550 μm . Los machos se

encontraban en espermiación. En este muestreo se observaron ovocitos maduros, sin embargo por la frecuencia tan baja (1.5%), las sardinas permanecieron un periodo adicional de 30 días para permitir que el proceso de maduración continuara y la proporción de ovocitos maduros se incrementara (**Fig. 16-C**).

El factor de condición promedio de las sardinas fue similar a lo largo del periodo de 111 días de exposición a un régimen controlado de fotoperiodo y temperatura ($X^2 = 3.20$, $P > 0.05$), sin embargo, al final del periodo se observó una menor variabilidad (**Fig.18**).

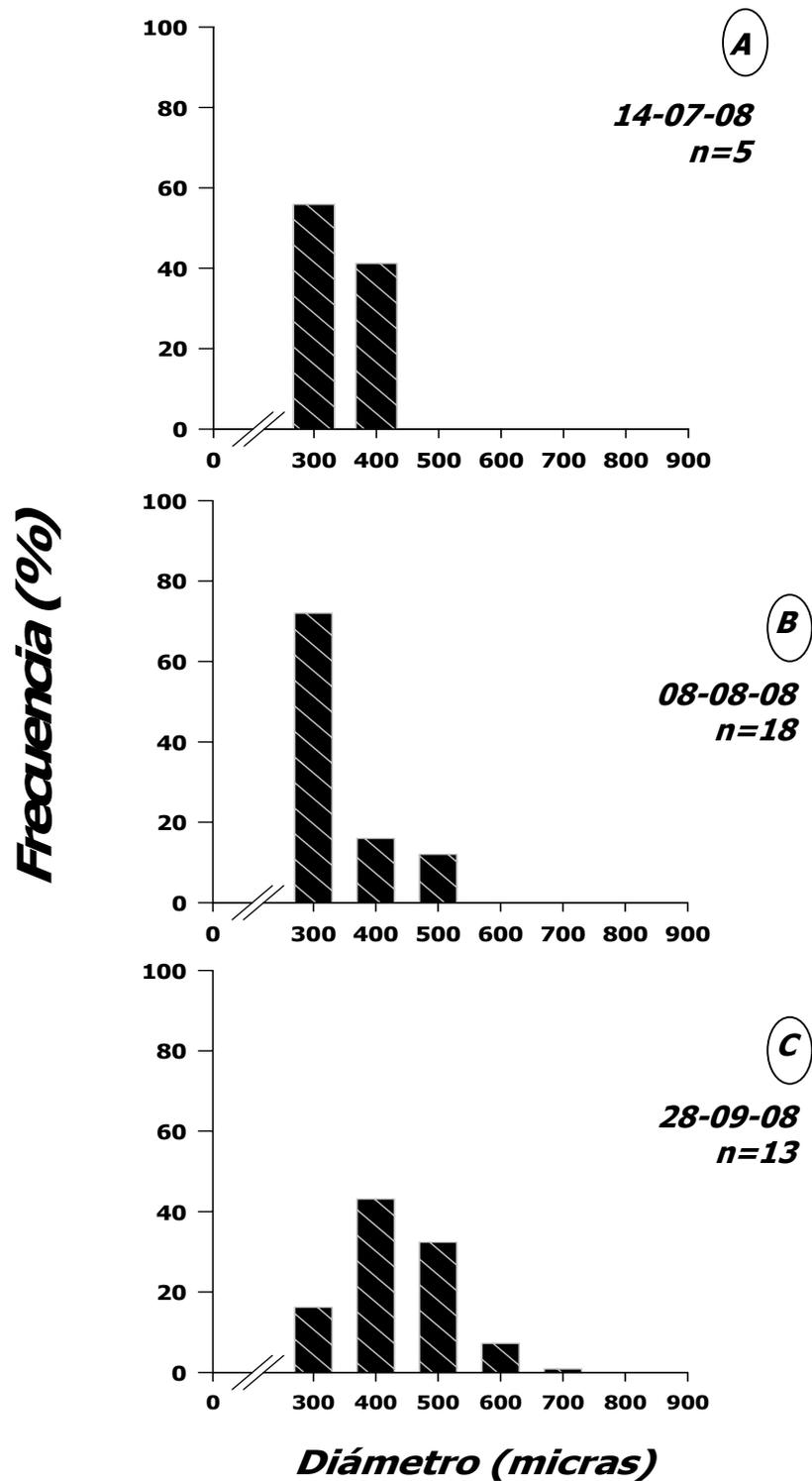


Figura 16. Distribución de frecuencias de los diámetros de los ovocitos de la sardina del Pacífico, *Sardinops sagax caeruleus*, en muestreos consecutivos durante el proceso de acondicionamiento reproductivo con control de fotoperiodo y temperatura.

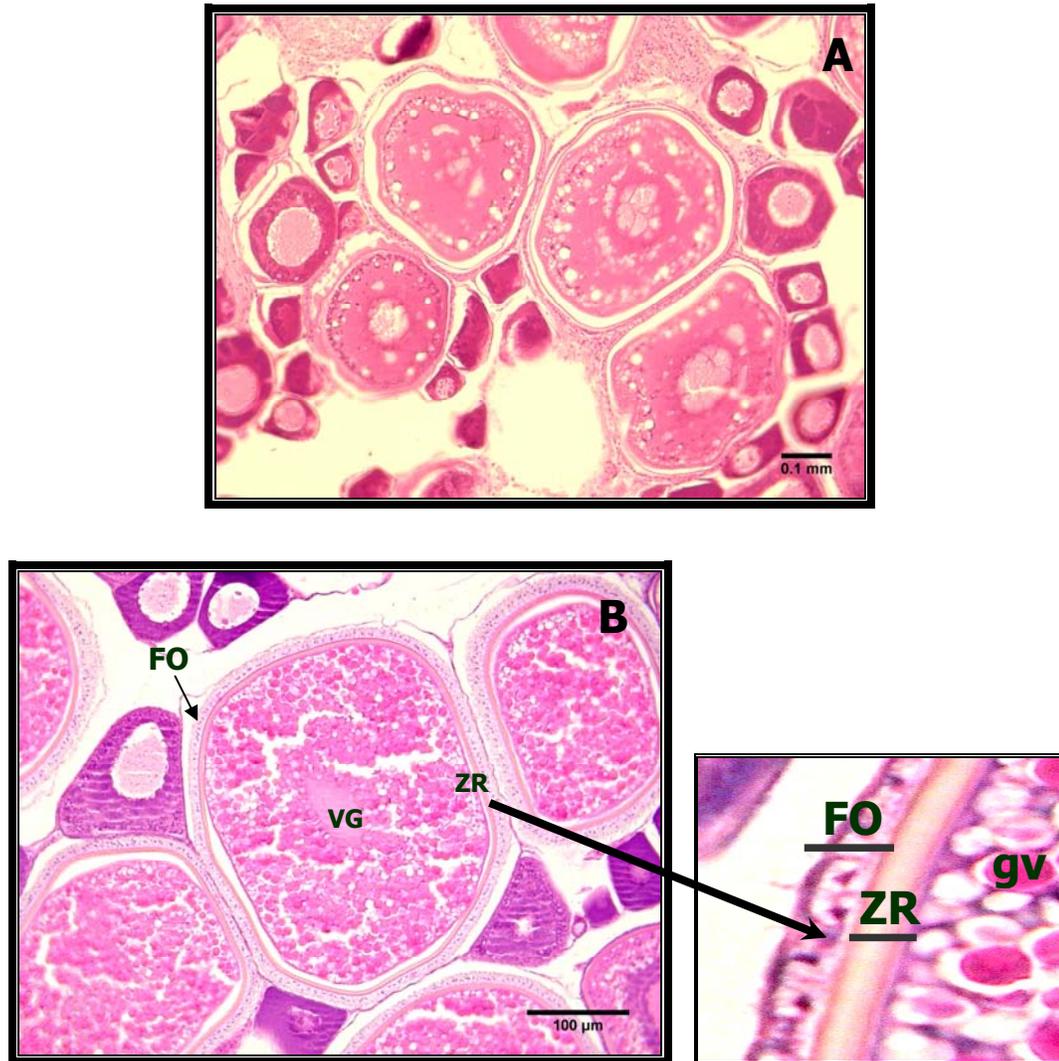


Figura 17. Microfotografías A. Ovocitos en maduración: 300-500 μm . 100X. B. Ovocitos en vitelogénesis tardía: 600-700 μm . 200X. ZR: Zona Radiata, FO: Folículo Ovárico, VG: Vesícula Germinal y gv: gránulos de vitelo.

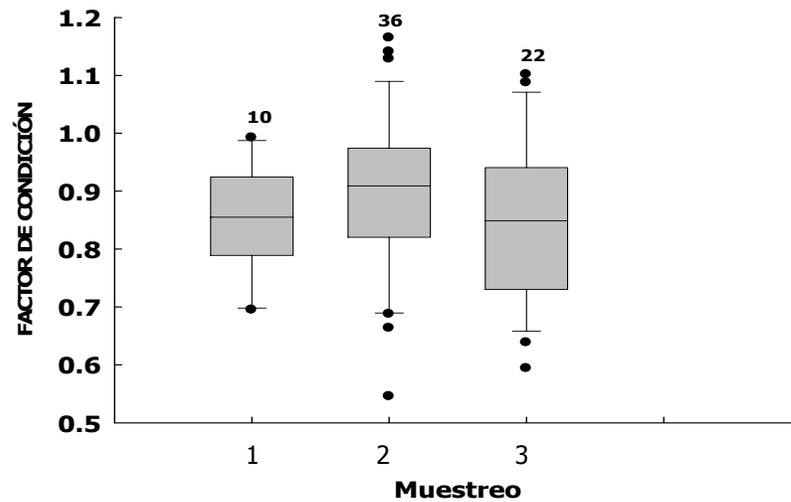


Figura 18. Factor de condición de la sardina del Pacífico, *Sardinops sagax caeruleus* en muestreos consecutivos durante el proceso de acondicionamiento reproductivo con control de fotoperiodo y temperatura. La línea horizontal dentro de las cajas representa la mediana, los límites superior e inferior incluyen el 50% de los datos, las cotas superior e inferior el 95% de los datos y los círculos negros los valores extremos.

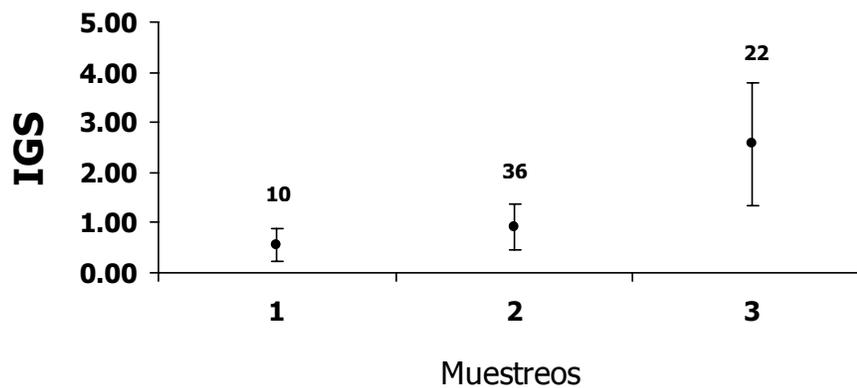


Figura 19. Índice Gonadosomático de la sardina del Pacífico *Sardinops sagax caeruleus* en muestreos consecutivos durante el proceso de acondicionamiento reproductivo con control de fotoperiodo y temperatura.

V.3.3. Inducción hormonal con GnRH α

Para inducir el desove de las sardinas previamente acondicionadas, se inyectó intraperitonealmente una sola dosis de 20 μg de GnRH α kg^{-1} a cada organismo. Durante el periodo de 96 h posteriores a la inyección, se tomaron muestras de 6 organismos cada 24 h. Se analizaron en total muestras de 6 ovarios de sardinas y 18 muestras testiculares. Donde el 96% de los peces estaban en el estadio III, con IGS mayor a 2. En este periodo el porcentaje de peces en maduración fue tan solo del 4%.

Se cuantificó el IGS para las hembras y los machos por separado. En las hembras, aunque no se observaron diferencias significativas conforme transcurría el tiempo, se registró una ligera disminución a las 72 horas, a las 96 horas no se obtuvieron hembras (**Fig. 20**). En los machos, el IGS sigue un patrón similar al de las hembras, aunque no se encontraron diferencias significativas, entre las 24 y las 72 h el índice disminuye y posteriormente, a las 96 h aumenta ligeramente, en este momento, de acuerdo con el análisis histológico, el grado de madurez observado fue mayor y los organismos se encontraban en el proceso de espermiación (**Fig. 21**). A diferencia de las hembras, en los machos la variación del índice fue menor.

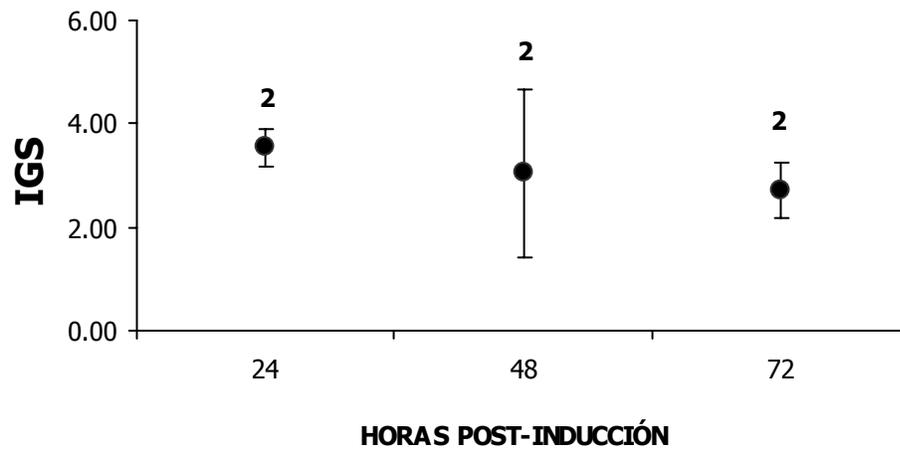


Figura 20. Evolución del índice gonadosomático de las hembras de la sardina del Pacífico, *Sardinops sagax caeruleus*, después de la inducción al desove con una dosis de 20 μg de GnRH a kg^{-1} .

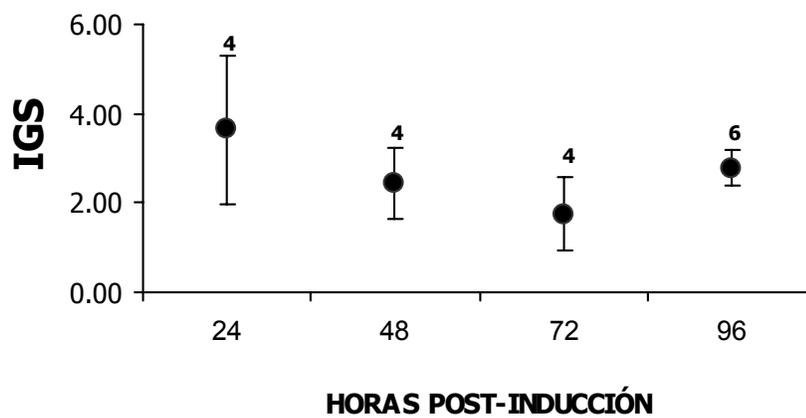


Figura 21. Evolución del índice Gonadosomático de los machos de la sardina del Pacífico, *Sardinops sagax caeruleus*, después de la inducción al desove con una dosis de 20 μg de GnRH a kg^{-1} .

El análisis histológico de las gónadas mostró que 24 horas después de la inyección se observaron ovocitos completamente vitelados con un diámetro de 500 y 600 μm (38 % y 47 % respectivamente) y ovocitos entre 400 y 500 μm , en la etapa de alvéolo cortical. A las 48 h se observaron ovocitos de un diámetro mayor (800 μm), aunque con una menor frecuencia (16 %), estos ovocitos se caracterizan por que se observa la vesícula germinal excéntrica, aunque los gránulos de vitelo no se observan completamente fusionados (coalescencia) (**Fig. 22**). En las siguientes 72 horas los ovocitos presentan tamaños que fluctuaron entre 300 y 600 μm con frecuencias porcentuales que van del 23 % al 33 %. El diámetro máximo observado fue de 600 a 700 μm , aunque la frecuencia fue menor (<10 %). La secuencia de maduración descrita anteriormente indica que la maduración ovárica en la sardina es por grupos, por lo que no se observa una distribución continua de los diámetros de los ovocitos, lo que significa que a medida que los ovarios maduran la distribución de los ovocitos sigue una distribución multimodal, de manera que aquellos ovocitos que tenían un diámetro de 300 μm , 24 h después de la estimulación hormonal el diámetro de este grupo modal es mayor (400 μm) lo mismo ocurre para cada moda en cada intervalo sucesivo. En la **figura 23** se observa que solo a partir del tercer muestreo (48 h después de la inducción) se observan células con diámetros superiores a las 700 μm , esto se puede deber a que durante las primeras 24 horas los ovocitos podrían aumentar su volumen por el proceso de hidratación y durante las siguientes 72 h, los ovocitos no desovados son reabsorbidos. Con respecto a los machos, el análisis histológico indicó que se encontraban en el proceso de espermiación (estadio III, maduro).

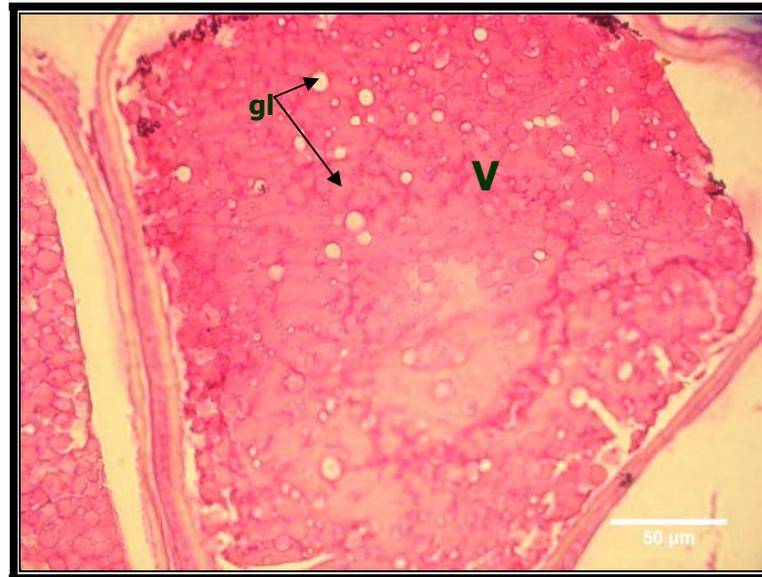


Figura 22. Ovocito maduro con un diámetro de 800 μm , se observan los gránulos de vitelo (V) en el proceso de coalescencia y numerosas gotas de aceite (gl) 400X.

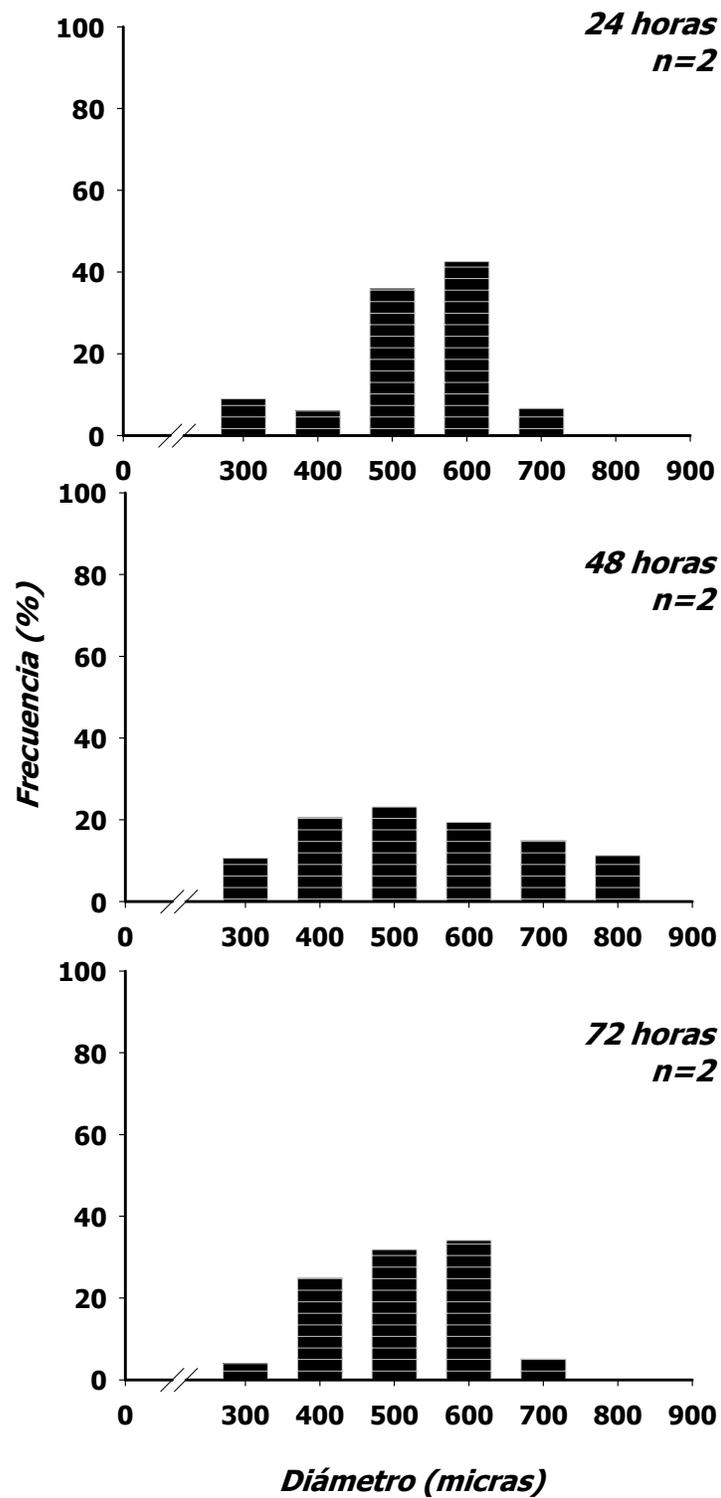


Figura 23. Distribución de frecuencias de los diámetros de los ovocitos de la sardina del Pacífico, *Sardinops sagax caeruleus*, en muestreos consecutivos posteriores a la inducción con una dosis de 20 μg de GnRHa kg^{-1} .

V.3.4. Cuantificación de esteroides sexuales en el plasma de la sardina del Pacífico

Para comprender el efecto del fotoperiodo y la temperatura sobre la maduración sexual de la sardina del pacífico se estudiaron los perfiles hormonales durante el periodo experimental. Para cuantificar los esteroides inductores de la maduración final ($17,20\beta$ -P y $17,20\beta,21$ -P), el Estradiol y la 11-Ketotestosterona, incluyendo sus fracciones libres y conjugadas, se extrajo una muestra del plasma de la sangre de la sardina del Pacífico, antes y después de la segunda inducción al desove bajo un régimen de fotoperiodo y temperatura. Con las muestras de plasma se desarrollaron los radioinmunoensayos (RIAs) correspondientes para cuantificar las concentraciones de los esteroides, cada análisis se hizo por duplicado.

Curvas estándar y sensibilidad del ensayo:

Los estándares y las muestras de las fracciones de TLC se procesaron conjuntamente. La curva estándar se rectificó mediante la transformación logit:

$$\text{Logit CPMst} = \text{Ln} \left(\frac{100 \times (\text{CPMst}/M)}{100 - (100 \times (\text{CPMst}/M))} \right) \quad (4)$$

Donde: CPMst = Media de las CPM de cada concentración estándar.

Regresión lineal de la curva patrón:

$$\text{Logit CPMst} = A + B \times \text{Ln} (\text{Cst}) \quad (5)$$

Donde Cst representa la concentración conocida de cada estándar.

Las curvas estándar se construyeron mediante transformación logit con el propósito de linealizar la curva, de esta manera se facilita la lectura por interpolación de las muestras desconocidas. Las curvas estándar para los tres esteroides libres en el plasma como el EIM $17,20\beta$ -P, 11-Ketotestosterona y E_2 mostraron un intervalo de sensibilidad óptimo de 0.5 a 50 ng/tubo (**Fig. 24**). Por otra parte las uniones inespecíficas para $17,20\beta$ -P fueron del 3.69 %; para

11-Ketotestosterona y E₂ fueron menores que 2.28 y 2.29 % respectivamente de la radioactividad del ensayo.

La sensibilidad del ensayo definida como la menor cantidad de esteroide que es distinta del cero estándar, fue de 50 ng/tubo para 17,20β-P, 25 ng/tubo para 11-Ketotestosterona y fue menor para el Estradiol, 10 ng/tubo.

Precisión:

La precisión fue evaluada determinando la variación intraensayo de las diferentes curvas estándar de los esteroides con dos replicas de cada concentración (**Tabla XI**). El coeficiente de variación fue menor a 10%, estos valores se encuentran dentro de los límites aceptables para cada ensayo.

Tabla XI. Cuentas por minuto (CPM) y coeficiente de variación (CV) de los radioinmunoensayos (RIA) de las fracciones libres de los esteroides de la sardina del Pacífico. Los valores corresponden a la media ± desviación estándar.

<i>Esteroides</i>	<i>CPM</i>	<i>CV</i>
<i>17,20β-P</i>	5032±113	2.24%
<i>11-KT</i>	4681±120	2.56%
<i>E₂</i>	3384±199	5.88%

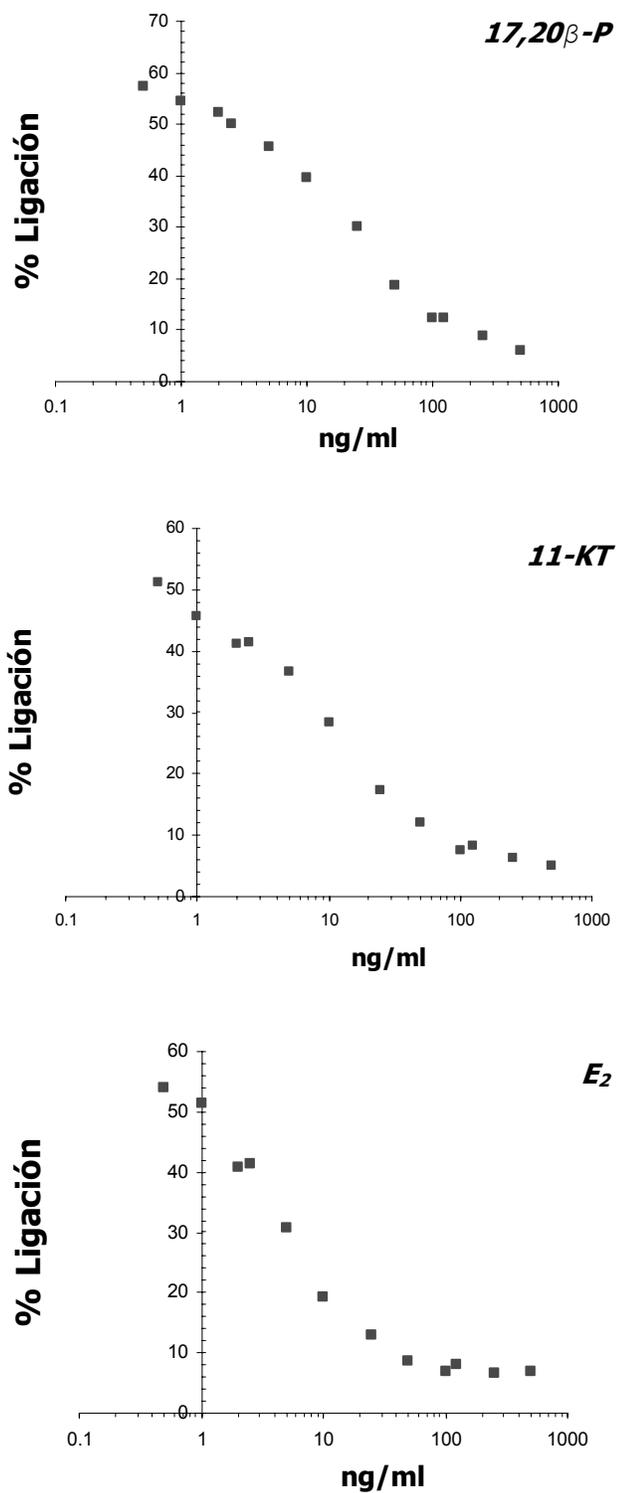


Figura 24. Curvas estándar promedio para las fracciones libres de los esteroides 17,20β-P, 11-KT y E₂ cuantificados por la técnica de radioinmunoensayo (n=2).

RIA fracciones para esteroides libres:

En la figura 25 se muestra la concentración de los esteroides libres inmunoreactivos cuantificados en las fracciones eluidas del cromatograma de capa fina (TLC). Las concentraciones de los esteroides conjugados no se muestran pero su distribución es similar a la de los esteroides libres. En la gráfica se puede observar la posición en la que se identificó el esteroide control correspondiente, s fracciones, solo le pudo cuantificar la concentración de la 11-Ketotestosterona, se observa un pico en la fracción siete. Aunque para el estradiol se observan varios picos, los valores son menores a 0.20 ng/ml, esto se puede deber a que este esteroide se degrada rápidamente. El esteroide inductor de la maduración $17,20\beta\text{-P}$, no se detectó (fracciones 8 a 13), por lo que se midió el esteroide $17,20\beta,21\text{-P}$ y aunque se observó un pico pequeño en la fracción 4, la concentración es < 0.20 ng/ml, lo cual no indica con claridad la presencia de este esteroide.

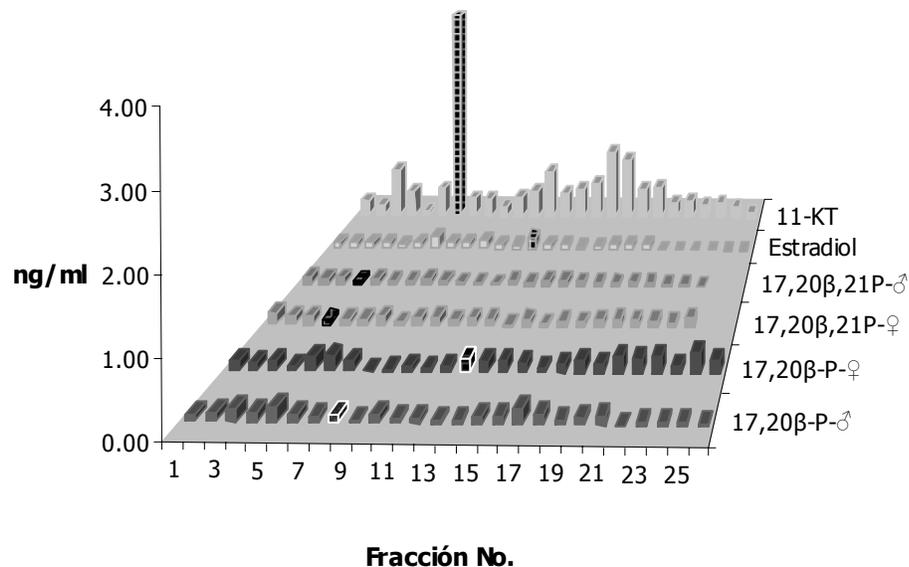


Figura 25. Concentración de los esteroides libres extraídos del plasma de la sardina del Pacífico, *Sardinops sagax caeruleus*. Las barras indican la concentración del esteroide en cada fracción eluída del cromatograma en capa fina (TLC) y medida por el método de radioinmunoensayo. Las barras de color diferente muestran la posición en que se eluyó el control positivo para cada hormona.

Radioinmunoensayo de los tratamientos:

Aunque también se cuantificaron los esteroides conjugados estos no serán presentados debido a que solo interesan los niveles de esteroides libres en el plasma, ya que son los responsables de coordinar el proceso de maduración gonadal. La génesis de los esteroides involucra la síntesis y secreción, el transporte (que puede ocurrir en forma libre, o asociada a proteínas transportadoras específicas o genéricas como las globulinas) y la depuración, que ocurre a través de la orina o de la materia fecal, con este propósito, los esteroides son desactivados en el hígado al conjugarse con dos grupos químicos, el ácido glucurónico y sulfatos.

Como se mencionó en el apartado V.3.3, cada 24 h y hasta completar un periodo de 96 h se tomó una muestra de sardinas a las que también se les extrajo una muestra de sangre, de la cual se separó el plasma para la cuantificación de los esteroides.

Al comparar la concentración de esteroide inductor de la maduración $17,20\beta$ -P en el plasma de las hembras antes de aplicar la hormona con respecto a las concentraciones medidas después de la estimulación hormonal, no se observan cambios importantes. A medida que transcurren las horas, todas las concentraciones del esteroide se encuentran por debajo del valor basal (0.55 ng/lm). Sin embargo, a las 24 horas la concentración tuvo un ligero incremento, (0.80 ng/ml), esta fue la mayor concentración de $17,20\beta$ -P medida en estas sardinas. En los machos se observa una tendencia similar para este esteroide, los valores hasta las 72 horas están por debajo del valor basal (0.07 ng/ml), excepto a las 96 horas cuando se incrementa hasta una concentración ligeramente superior a 1 ng/ml. En los machos, la variabilidad en las medidas de la concentración fue menor y más homogénea que en las hembras (**Fig. 26**).

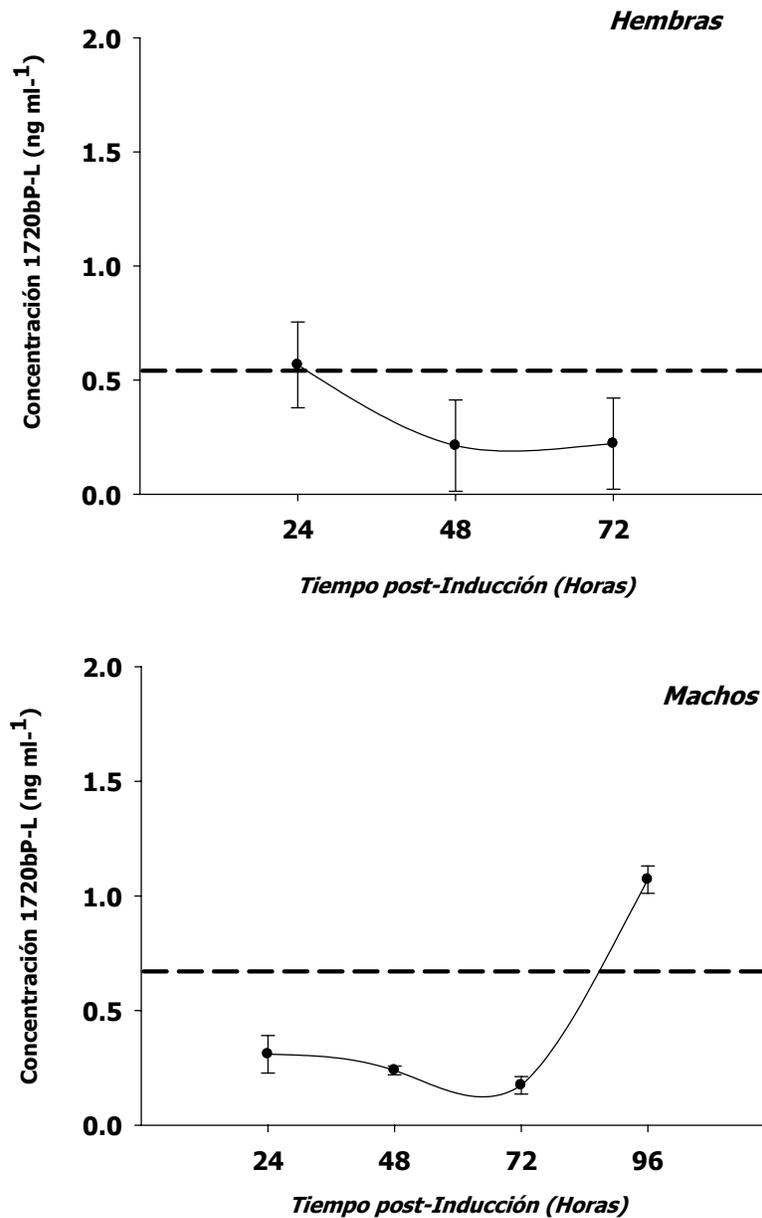


Figura 26. Niveles plasmáticos del esteroide inductor de la maduración final ($17,20\beta$ -P) de la sardina del Pacífico, *Sardinops sagax caeruleus*, después de la inducción al desove con la hormona GnRH α . La línea punteada indica la concentración basal del esteroide. La línea vertical indica la desviación estándar.

Se detectó y cuantificó otro esteroide inductor de la maduración para esta especie, el 17,20 β ,21-P. En las hembras las concentraciones y tendencias difieren con respecto a las observadas para el 17,20 β -P. En las primeras 24 horas la concentración del EIM 17,20 β ,21-P es similar a la de los niveles basales (0.07 ng/ml), a las 48 horas la concentración promedio se incrementa casi al doble, aunque en un organismo se registró una concentración cercana a los 2 ng/ml, cabe señalar que en el análisis histológico se observó que el máximo diámetro de los ovocitos era de 800 μ m, con una frecuencia relativamente alta, que indicaba un estado avanzado de maduración. A las 72 horas, la concentración de este esteroide disminuyó.

En los machos el 17,20 β ,21-P presenta una tendencia similar al del 17,20 β -P. En las primeras 24 horas después de la inyección de GnRH α , la concentración es superior a la inicial (0.04 ng/ml), posteriormente, a las 48 y 72 horas disminuye (0.03 y 0.02 ng/ml), a las 96 horas la concentración aumenta más de tres veces con respecto al nivel inicial (1.04 ng/ml) (**Fig. 27**).

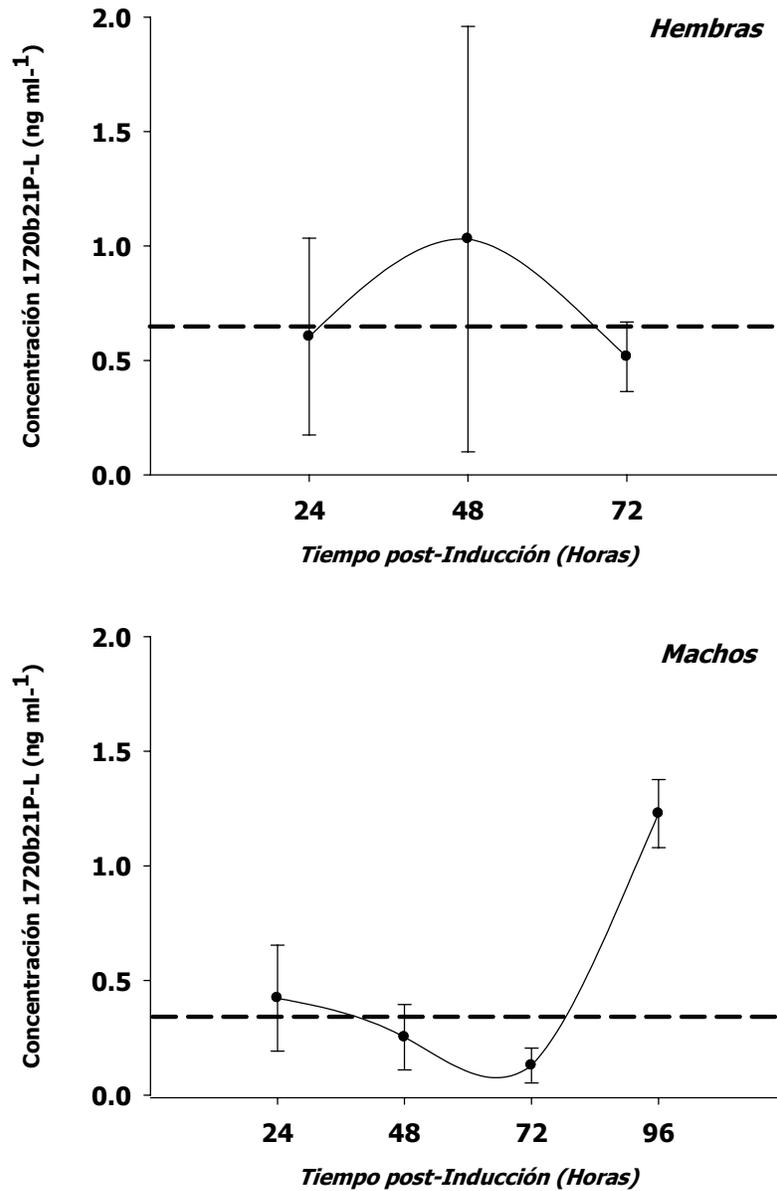


Figura 27. Niveles plasmáticos promedio del esteroide inductor de la maduración final ($17,20\beta,21\text{-P}$) en la sardina del Pacífico, *Sardinops sagax caeruleus*, después de la inducción al desove con la hormona GnRH α . La línea punteada indica la concentración basal del esteroide. Las líneas verticales indican la desviación estándar.

El estradiol es uno de los esteroides más importantes en el proceso reproductivo de las hembras, los resultados muestran claramente que las concentraciones de estradiol (E_2) presentan una tendencia creciente a partir de las 24 horas, sin embargo, las concentraciones son menores que las registradas inicialmente (0.50 ng/ml), a las 72 horas se observa un importante incremento (0.55 ng/ml), de casi dos veces la concentración medida a las 48 h, sin embargo, esta concentración solo es ligeramente superior a la registrada antes de la inyección de la GnRH α (**Fig. 28**).

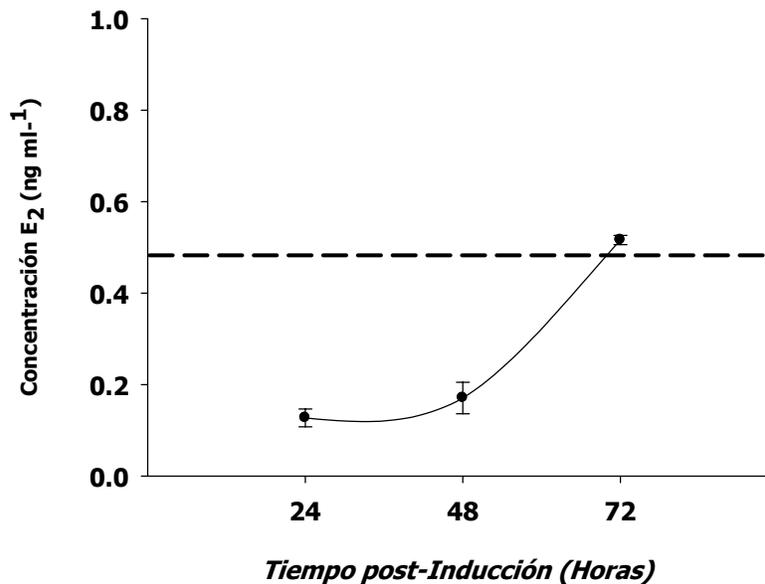


Figura 28. Niveles plasmáticos de estradiol (E_2) de la sardina del Pacífico, *Sardinops sagax caeruleus*, después de la inducción al desove con la hormona GnRH α . La línea punteada indica la concentración basal del esteroide. Las líneas verticales indican la desviación estándar.

La 11-Ketotestosterona es un andrógeno que sólo se sintetiza en los machos. El análisis de las muestras de plasma reveló que a las 24 horas la concentración era de 0.45 ng/ml, inferior a la registrada antes de la estimulación hormonal (0.58 ng/ml) y decreció en las próximas 24 h a una concentración menor a 2 ng/ml, posteriormente se incremento hasta alcanzar 0.7 ng/ml a las 96 h, una concentración superior a la registrada inicialmente (**Fig. 29**).

Cabe destacar que las concentraciones de todos los esteroides estudiados estuvieron por debajo del nivel basal durante las primeras 72 horas, solo después de este periodo se observo un incremento en la concentración en los machos. En los muestreos realizados a las 96 h no se encontraron hembras, por lo que no se pudo establecer si el efecto de la inducción con GnRH α es similar al observado en los machos.

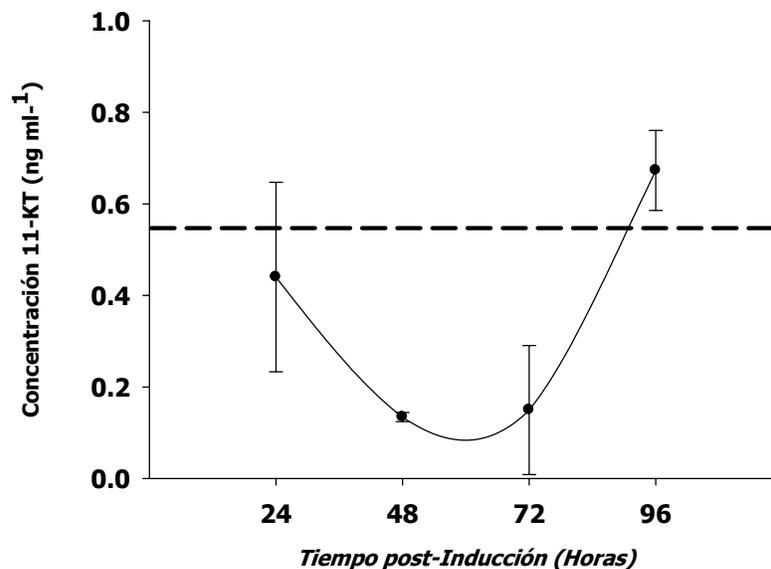


Figura 29. Niveles plasmáticos de 11-Ketotestosterona (11-KT) en los machos de la sardina del Pacífico, *Sardinops sagax caeruleus*, después de la inducción al desove con la hormona GnRH α . La línea punteada indica la concentración basal del esteroide. Las líneas verticales indican la desviación estándar.

VI. DISCUSIÓN

Es de amplio conocimiento que los primeros estadios (huevos, larva y etapas tempranas de juveniles) son críticos para las fluctuaciones en la abundancia de las poblaciones de peces explotadas, como es el caso de la sardina del Pacífico *Sardinops caeruleus*. En los últimos años se ha extendido una nueva visión acerca de la importancia de comprender la reproducción para entender las estrategias que siguen estos organismos de manera que permitan explicar el potencial reproductivo y la capacidad de recuperación de los recursos pesqueros. Para la sardina este aspecto es importante por representar una de las principales pesquerías del país y un importante eslabón de la cadena trófica del ecosistema marino costero de México.

Para la elaboración de la escala de maduración que se propone en este trabajo se utilizaron organismos que fueron capturados por embarcaciones pesqueras dedicadas al aprovisionamiento de carnada para la pesca deportiva y también se utilizaron muestras de organismos que permanecieron en los estanques de acondicionamiento reproductivo que formaron parte de este estudio. Esta estrategia fue necesaria para que en la muestra que se analizó estuvieran presentes los diferentes estadios de maduración, incluyendo aquellos estadios que en otros estudios han representado un porcentaje muy reducido de las muestras analizadas (Clark, 1931).

VI.1. Maduración gonadal

Los criterios de clasificación del desarrollo gonadal ovárico incluyeron el tamaño de los ovocitos, la proporción y distribución de los diferentes tipos y estadios celulares, presencia de inclusiones celulares y su morfología (tomando como referencia la presencia o no de gránulos de vitelo en el ovocito) (Carrillo y Zanuy, 1993). De acuerdo con estas características, el desarrollo gonadal de la

sardina del Pacífico, *Sardinops sagax caeruleus* es asincrónico, de manera similar a lo que se ha observado en otros teleósteos como la dorada (*Sparus aurata*), el lenguado (genero *Solea*) y el rodaballo (*Psetta maxima*) (Torres-Villegas *et al.*, 1985; Zanuy y Carrillo, 1987; Carrillo y Zanuy, 1993). Las especies que maduran asincrónicamente se caracterizan también porque desovan en forma parcial, el crecimiento ovocitario se lleva a cabo a partir de pequeñas cohortes de ovocitos, que se evidencia por su distribución, que como en este estudio, es multimodal. Durante el periodo de máximo desarrollo gonadal, están presentes todos los estadios de desarrollo de los ovocitos, por ello en esta especie la época de puesta suele ser larga y la ovoposición múltiple (Zanuy y Carrillo, 1987).

Clark (1931), describió el desarrollo gonadal de la sardina del Pacífico a partir de una serie de muestras colectadas en diferentes localidades del sur de California, empleando como criterio principal la distribución de diámetros de los ovocitos. Cabe señalar que el trabajo de Clark fue fundamental para este estudio ya que sirvió de base para el análisis microscópico, de tal forma que los resultados que aquí se presentan complementan la clave de maduración y amplían su uso, ya que facilitan la toma de decisiones cuando se desea inducir el desove de organismos que se mantienen en cautiverio y que no desovan de manera espontánea. Aunque en este trabajo no se logró obtener un desove, los resultados alcanzados permitirán avanzar en este sentido sobre una base más sólida, aumentando las posibilidades de obtener desoves en forma controlada y que servirán de base para emprender otros estudios orientados a comprender el desarrollo temprano de esta especie. Con este mismo fin se tomó en cuenta lo descrito por Plaza-Guido *et al* (2002) para la sardina del norte de Chile, dándole solidez al presente trabajo en la descripción morfológica de los ovocitos, solo que la estimación de las frecuencias modales para la sardina del pacífico de esta región, tuvo un intervalo de los diámetros mas amplio y se pudo observar el comportamiento de las frecuencias multimodales, ya que

Plaza-Guido y colaboradores solo tomaron la moda intermedia y la mas avanzada del diámetro de los ovocitos.

Debido al tipo de desove la proporción de ovocitos inmaduros siempre será mayor que la proporción de ovocitos maduros, por lo que es indispensable observar el avance de la proporción de los ovocitos que se encuentran en maduración respecto a los ovocitos inmaduros. Sin embargo a medida que van avanzando los diámetros la proporción de los inmaduros va disminuyendo dentro de una misma época de desove.

En el caso de los peces teleósteos, el proceso de maduración en los machos es más simple cuando se evalúan los cambios morfológicos, en comparación con el que se observa en las hembras (Zanuy y Carrillo, 1987).

Para que la reproducción sea exitosa, uno de los requisitos necesarios es que la maduración de los machos y de las hembras ocurra de manera sincrónica o que por lo menos, el momento final de la maduración esté sincronizado. Esta sincronía se logra por la interacción del sistema sensorial y hormonal con el medio ambiente, que incluye las fluctuaciones ambientales y las interacciones sociales, de tal forma que los desoves se produzcan invariablemente en la época del año que ofrezca mayor garantía para la supervivencia. Esta sincronía entre la fisiología reproductiva de los peces y el entorno natural se da a través de complejas interacciones a nivel del eje cerebro-hipófisis-gónadas (Zanuy y Carrillo, 1987).

Los factores que afectan la maduración gonadal tales como el fotoperiodo, la temperatura, salinidad, flujo de agua, oxígeno, ausencia de depredadores y la dieta, entre otros, provocan alteraciones de los ciclos sexuales y del comportamiento reproductor (Zanuy y Carrillo, 1987), en este caso se observó que en cautiverio, la sardina madura sexualmente pero no desova, contrariamente, se inducen procesos de atresia y maduración asincrónica entre

hembras y machos (Zanuy y Carrillo, 1993). Todo esto lleva a la conclusión que para controlar la reproducción de la sardina del Pacífico, es necesario realizar estudios básicos de la fisiología reproductiva.

En los peces pelágicos menores la maduración ovárica es un proceso que depende de la longitud de las hembras (Pizarro, 1990; Claramunt *et al.*, 1994; Herrera *et al.*, 1994), en *Sardinops sagax*, se ha observado tanto en los trabajos realizados por Clark (1931); Paza-Guido (2002) y en el presente trabajo, que hay una relación directa entre la longitud y grado de madurez, a mayor tamaño de los organismos mayor es el grado de madurez. Según Clark (1931), la edad de primera madurez es de 18 cm para la sardina de California, y encontró que el 100% de organismos maduros tenían una longitud superior a los 27 cm. Coteró (2006), encontró que la talla de primera madurez para la zona de Baja California, México, es de 17 cm, en este estudio, las sardinias con mayor grado de maduración tenían longitudes mayores a 22 cm.

El conocimiento de la fisiología reproductiva tiene aplicación en el desarrollo de técnicas de control reproductivo que incluyen la manipulación ambiental y que han dado lugar a importantes logros en la reproducción en cautiverio en muchas especies de peces. Estas técnicas han permitido aplicaciones tan importantes como la sincronización y modificación del periodo natural de desove, que han propiciado un incremento en la productividad reproductiva y en la producción de huevos y juveniles de buena calidad.

VI.2. Acondicionamiento reproductivo en un régimen natural de fotoperiodo y temperatura e inducción al desove con GnRH α

Con la finalidad de definir el momento más adecuado para realizar la inducción al desove de *S. sagax caeruleus*, se analizó el desarrollo gonadal de un grupo de sardinias que se mantuvieron en cautiverio durante el periodo comprendido de Junio del 2007 a Octubre del 2008. Con este propósito se utilizó la escala de

maduración gonadal previamente elaborada. La aclimatación de los organismos a un ambiente artificial fue un proceso crítico, en el que se registraron altas mortalidades, debido posiblemente al estrés, producto del proceso de captura, transporte y confinamiento, así como por los cambios bruscos de temperatura ($\pm 1.9^{\circ}\text{C}$ por día), ya que en cautiverio, las sardinas experimentaron mayor variabilidad térmica que en su medio natural (Sverdrup, *et al.*, 1970; Higareda, 2009 comunicación personal).

El uso, manejo y aclimatación del biofiltro (Malone, 2006), fue otro factor que tuvo un efecto en la alta mortalidad de los peces durante los primeros meses de confinamiento. Al comenzar este experimento, el sistema de filtración no se encontraba capacitado para eliminar los desechos nitrogenados, ya que la colonización de las bacterias *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* puede durar entre semanas y meses, dependiendo de la temperatura del agua y de la carga orgánica del sistema, entre otras variables.

Para la evaluación de la condición general de los organismos se utilizaron diferentes índices y características de la morfología y citología ovárica y testicular. De estos índices, el factor de condición de Fulton no es un buen estimador de la maduración sexual, debido a que la relación entre la longitud y la masa de los organismos no tiene una correlación significativa con el grado de madurez observado. Aunque el índice gonadosomático es un índice que si aporta información sobre el estado reproductivo, esta información es muy general y no indica de manera específica el estado de madurez en el que se encuentran los organismos. Este índice es afectado negativamente cuando la longitud y la masa de los organismos en una muestra es heterogénea (De Vlaming, *et al.*, 1982). En este sentido, las muestras analizadas en este trabajo fueron muy homogéneas, ya que fueron seleccionadas previamente por el arte de pesca y posteriormente al seleccionar a los organismos que se dedicarían al experimento, por lo que las estimaciones de la madurez realizadas con base en

el IGS son buenas pero no suficientes para establecer con precisión el momento idóneo para la inducción al desove utilizando terapia de estimulación hormonal.

La inducción al desove consiste en estimular la síntesis del EIM, este progestágeno es el responsable de la maduración final del ovocito (MFO) y de la ovulación en las hembras y de la espermiación en los machos (Nagahama, 1997). Con la finalidad de obtener huevos fértiles, en diferentes especies de peces marinos se han aplicado diversos tratamientos tanto ambientales como hormonales para la maduración y el desove. En la sardina del Pacífico se utilizó la técnica de inducción al desove con la aplicación de GnRHa, solo cuando se encontraron organismos en un estado adecuado de maduración. Esta técnica ha sido utilizada por diferentes autores (Prat *et al.*, 2001; Cisneros *et al.*, en prensa; Olmedo *et al.*, 1990), para la reproducción asistida. En este estudio se observó que después de aplicar el estímulo hormonal, el 66 % de las hembras inducidas se encontraban en maduración y el 57 % de los machos estaban inmaduros, por lo que no se pudo obtener el desove. Una condición para que ocurra el desove es que los organismos deben encontrarse maduros, esto significa que en las hembras, una fracción de los ovocitos (1.5 %, Clark 1931) estén finalizando el proceso de vitelogénesis y comenzando la maduración final (MFO). En este proceso, ocurren cambios tanto a nivel nuclear como citoplasmáticos; estos cambios consisten principalmente en la migración de la vesícula germinal (Vg) hacia el polo del ovocito (polo germinal) donde se encuentra el micrópilo, su ruptura y la condensación de los cromosomas que entran en la primera metafase meiótica (que fue detenida en profase durante la vitelogénesis) y que es seguida de la extrusión del primer cuerpo polar (Gilkey, 1981; Carrillo y Zanuy, 1993). Durante la migración de la Vg las gotas lipídicas y de los glóbulos de vitelo coalescen (Nagahama, 1987; Jalabert *et al.*, 1991; Redding y Patiño, 1993).

En la anchoveta peruana *Engraulis rigens*, la inducción al desove se ha realizado utilizando un protocolo similar pero con diferentes análogos de la GnRH, en la

anchoveta norteña (Cisneros *et al*, en prensa), se utilizó busserelina (conceptal®) y en la sardina del Pacífico, en este trabajo, se utilizó cystorelin®. En la anchoveta peruana se produjeron desoves a las 24 y 48 h, sin embargo, el número de desoves fue pequeño y con un número reducido de huevos viables. En la lubina (*Dicentrarchus labrax*), también se indujo el desove con la GnRH α , en este caso se utilizó una preparación comercial ([D-Ala⁶, Pro⁹-Net]-GnRH, Syndel, Canadá) y se aplicó cuando las hembras se encontraban en vitelogenesis tardía, desovaron 72 horas después de la segunda inyección y a las 96 horas pero el porcentaje de huevos viables fue bajo (Prat *et al.*, 2001). Estos resultados indican que la terapia hormonal es suficiente para desencadenar la maduración final e inclusive la ovulación y el desove, pero para asegurar la viabilidad de los óvulos, en forma simultánea deben ocurrir otros procesos, por lo que es necesario conocer con mayor precisión los procesos que aseguran una reproducción exitosa.

En este trabajo se observó que además de la ausencia de desove, el efecto de la inducción con la GnRH α se caracterizó por el grado de atresia folicular (interrupción del desarrollo y reabsorción del ovocito) (Byskov, 1978). Aunque no se encontraron diferencias significativas entre el control y los tratamientos, en los organismos que recibieron la dosis más alta se cuantificó un alto porcentaje de folículos atrésicos. Este fenómeno se da de manera natural en una pequeña fracción de los folículos, se puede decir que para la sardina del Pacífico las frecuencias de atresia se consideran como normales cuando se presenta alrededor del 2% del total de los folículos en el ovario (Torres-Villegas, 1997).

En otros peces pelágicos, como en *Trachurus trachurus*, la frecuencia de folículos atrésicos es más alta, cercana al 20% (Priede, 1994). Si embargo, en este estudio, la frecuencia fue de 40 % en promedio. Los factores que inducen los procesos atrésicos durante la maduración son varios, y pueden actuar en asociación o por si solos, como: i) Factores ambientales inadecuados, como la

calidad del agua o la temperatura (Fedorov, 1971; Burton & Ildler, 1984); ii) Una condición nutricional deficiente o por inanición (Scott, 1962; Wooton, 1973; Maddock y Burton, 1994); iii) Una dosis inadecuada de la hormona liberadora de gonadotropinas.

Por medio de la histología se pudo observar que la atresia se puede presentar en todos los estadios de desarrollo gonadal, desde la previtelogenesis hasta los estadios más avanzados, que se caracterizan por el inicio de la migración de la vesícula germinal y la coalescencia del vitelo y las gotas de aceite. La atresia folicular ocurre de forma similar en todas las especies de peces, las células de la granulosa invaden el citoplasma del ovocito y digieren el vitelo, estas células fagocíticas finalmente degeneran (Guraya, 1986).

El estrés en los reproductores, como la respuesta fisiológica a los factores ambientales extremos, es el proceso que induce la reabsorción de los ovocitos, especialmente de los vitelados, ya que afectan la calidad de los gametos y en última instancia impiden el proceso reproductivo (Torres-Villegas, 1997). Es probable que en este estudio las sardinas hayan experimentado condiciones de estrés al permanecer confinadas en un espacio relativamente reducido, asociado también a la metodología que se siguió para la inducción, la manipulación relacionada con la medición del peso y la longitud, así como la inyección y el confinamiento en los estanques de desove (272 l).

Además del manejo de los organismos y las técnicas de desove, el estado nutricional de los reproductores es un factor clave que afecta los procesos reproductivos en los peces (Hardy, 1985; Luquet y Watanabe, 1986; Bromage, 1998). Por tal motivo, las dietas balanceadas deben tener un alto contenido de proteína con una composición de aminoácidos adecuada, la composición lipídica debe incluir ácidos grasos (principalmente polinsaturados), vitaminas E, C, A, D3, complejo B, y trazas de minerales, los cuales son especie-específicos. Para la sardina del Pacífico no se ha formulado una dieta que cumpla con sus

requerimientos esenciales, es evidente la razón, ya que hasta ahora es una especie de interés pesquero y no acuícola. La composición de la dieta es muy importante para la reproducción, porque muchos de los nutrientes que se acumulan en los ovocitos durante la vitelogénesis, provienen de la dieta, el efecto de una dieta deficiente es particularmente importante en aquellas especies que desovan de manera continua, ya que tiene periodos de vitelogénesis relativamente cortos (Harel *et al.*, 1992; Izquierdo *et al.*, 2001).

Durante la vitelogénesis, las hembras necesitan alimento rico en proteína y lípidos para producir vitelogenina que es almacenada progresivamente como vitelo en los ovocitos y que posteriormente servirá como única fuente de alimento durante el desarrollo del embrión y primeros estadios vitales, por lo que la cantidad y calidad del vitelo son factores clave para una reproducción exitosa.

VI.3.- Inducción hormonal con la GnRH α bajo un régimen artificial de fotoperiodo y temperatura

Antes de que se ajustaran el fotoperiodo y temperatura, no se observaron indicios de la maduración gonadal en las sardinas, principalmente en las hembras, lo que se manifestó en el diámetro de los ovocitos, que no aumentó. Pankhurst y Thomas (1998) indican que las temperaturas elevadas y sostenidas en el tiempo pueden generar una incapacidad del folículo para sintetizar el 17,20 β -P, esteroide fundamental para la maduración de las gónadas de ambos sexos, por lo que en el primer periodo de acondicionamiento, una temperatura más elevada que en su medio natural fuera limitante para la maduración. No así, cuando el fotoperiodo y la temperatura se ajustaron con un descenso progresivo desactivándose el estado de latencia de la maduración gonadal y preparando a los organismos para un recrudescimiento gonádico (que se caracteriza por la acumulación de reservas de grasa "energía" en la cavidad abdominal), esta condición fue observada durante el diagnóstico del estado de

maduración. Una vez que se incrementó el número de horas luz y la temperatura, se observó un cambio en el diámetro de los ovocitos. Un proceso similar se observó en el pargo palmero *Lutjanus anaes* (Botero-Arango *et al.*, 2005). Es posible que en *Sardinops sagax caeruleus* sea indispensable una disminución de las horas luz y temperatura para disparar el desarrollo gonadal seguido de un incremento paulatino de estos factores ambientales para que inicie la maduración final, aunque aun no es claro el como la variación de estos factores regulan el proceso de maduración en esta especie.

Después del periodo de acondicionamiento reproductivo bajo un régimen de luz y temperatura, se realizó un segundo intento de inducción al desove con la aplicación de una inyección intraperitoneal de GnRHa. En este caso, los resultados mostraron que la administración de GnRHa induce la MFO, ya que a las 48 horas post-inducción, en los ovocitos con diámetros de 800 μm , se observó que la posición de la vesícula germinal era ligeramente excéntrica y los gránulos de vitelo se comenzaban a fusionar (proceso de coalescencia) en respuesta a la estimulación de una dosis hormonal alta, este proceso es una consecuencia de la adquisición de la competencia folicular, que consiste en el incremento de la sensibilidad del ovocito hacia ciertas hormonas y ocurre bajo el control de la GtH II (Nagahama, 1994; Patiño, 1993). Dicha competencia maduracional está asociada con el incremento de receptores para el EIM en la membrana del ovocito y el incremento en el número de uniones hendidas entre este y las células de la granulosa (Patiño, 1995). Cisneros (en prensa) solo obtuvo desove en la anchoveta peruana con la dosis de 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, sin embargo, Manrique (1988) refiere resultados negativos en *Diplectrum formosum*, con la misma dosis pero aplicada en diferentes intervalos de tiempo.

La hormona gonadotrópica análoga se ha empleado para inducir la ovulación en peces teleósteos tales como el ayu (*Plecoglossus altivelis*), pez dorado (*Carassius auratus*), carpa negra (*Mylopharyngodon piceus*), carpa común (*Cyprinus carpio*) y trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Donalson y Hunter,

1993) entre otros con resultados relativamente exitosos. Por lo cual se ha demostrado que esta hormona es altamente efectiva para inducir la maduración final, ovulación, espermiación y desove en las primeras 48 horas después del tratamiento (García, 1993), intervalo en el cual en este estudio se encontró el máximo desarrollo gonadal para la sardina aquí estudiada y que marcó el inicio de la maduración final.

El índice gonadosomático disminuyó en ambos sexos durante el transcurso de las horas posteriores a la inducción. El comportamiento del índice gonadosomático varía en los machos, aumentando durante la espermatogénesis y alcanza su máximo valor después de la meiosis, en el estadio de espermátocitos, posteriormente disminuye durante la espermiogénesis, por la eliminación del citoplasma de las espermátides y finalmente declina cuando los testículos pasan al estadio IV (en reabsorción). Un proceso diferente se observa en las hembras, cuando están inmaduras, el IGS presenta valores bajos y aumenta con el desarrollo gonadal y se observan valores altos en las etapas de maduración final, ya que los ovarios aumentan su volumen de 3 a 5 veces, debido al proceso de hidratación y finalmente, después del desove o de la reabsorción gonadal el índice disminuye (Carrillo y Zanuy, 1993).

De acuerdo con los resultados de este trabajo, se deduce que cada especie desova bajo condiciones particulares, por lo que la efectividad de la inducción está supeditada a la concentración de la dosis y al momento en que se suministra la hormona, a las condiciones de estrés de los reproductores, a la condición fisiológica y lo más importante, depende del grado de madurez gonadal que presenten los organismos.

VI.3.1. Cuantificación de esteroides

Como paso previo a la cuantificación de los esteroides con la técnica de radioinmunoensayo (RIA), los esteroides plasmáticos se extrajeron y purificaron por cromatografía de capa fina (TLC), con la finalidad de aumentar al máximo

la sensibilidad y evitar el riesgo de la aparición de reacciones cruzadas con otros esteroides.

Uno de los requerimientos del RIA es utilizar un buen método de separación de las fracciones ligada y libre del esteroide ensayado. El método más utilizado es el del carbón activado recubierto con dextrano (Wu y Lundy, 1971; Baynes y Scott, 1985), con este método se obtuvieron valores bajos de interferencias no específicas (< 4 %). Las curvas estándar se construyeron por transformación logit y mostraron poca variación, no obstante, este tipo de curvas presenta ciertos inconvenientes ya que los extremos son más imprecisos y en consecuencia los intervalos de confianza son más amplios (Chard, 1978). La precisión de los ensayos fue aceptable, ya que no se alejaron excesivamente de los márgenes propuestos por Chard (1978), Kime y Dolben, (1985).

Al comparar los resultados obtenidos con los de otros autores, se observó que para todos los esteroides libres las concentraciones fueron menores que las obtenidas en el arenque del Pacífico (*Clupea harengus*) y en la platija del mar del norte (*Pleuronectes platessa* L.) (Scott y Canario, 1989). En ambos trabajos, la concentración del EIM (17,20 β -P) en los machos fue baja, sin embargo, son mucho menores que los registrados en la trucha y otros salmónidos (Fostier *et al.*, 1982, 1983; Baynes y Scott, 1985). Aunque estuvieron de acuerdo con los observados en la lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) (Prat y Carrillo, 1986).

Se ha demostrado que los principales andrógenos producidos por los testículos de los peces y según la especie son el 17 β -hidroxi-4-androstene-3,11-diona (11-KT) o el 17 β -dihidroxi-4-androstene-3-ona (11 β -HT). Se ha observado que en el plasma de varias especies las concentraciones de testosterona (T), 11-KT y 11 β -HT fluctúan en forma significativa dependiendo de la etapa reproductiva en que se encuentren. Aparentemente la T esta asociada con la espermatogénesis, mientras que la 11-KT lo estaría con la espermiación (Carrillo y Zanuy, 1993). Si bien esto es cierto, la cromatografía de capa fina detectó claramente este

esteroide, lo cual indica que los machos se encontraban espermiantes y aunque las concentraciones fueron bajas, se observó un incremento progresivo. Scott, *et al* (1989) identificaron este esteroide en el fluido seminal de otro clupeido, el arenque del Pacífico (*Clupea harengus pallasii*), utilizando HPLC y encontraron concentraciones de 0.3 ng/g, valores inferiores a los cuantificados en el presente estudio. Con respecto al estradiol (E₂) los valores reportados para *S. sagax caeruleus* coinciden con los niveles reportados por Scott *et al*, (1990) para la lubina (*Dicentrarchus labrax*), con concentraciones menores a 0.4 ng/ml.

Actualmente no se ha encontrado referencia alguna de los niveles de esteroides en la sardina del Pacífico, por lo que este trabajo aporta conocimientos básicos sobre las concentraciones de esteroides sexuales (Estradiol, 11-Ketotestosterona, 17,20 β -P y 17,20 β ,21-P) en el plasma. En términos generales, las concentraciones medidas después de la estimulación hormonal estuvieron por debajo de los niveles previos. Esto probablemente indica que las sardinias estuvieron expuestas a condiciones estresantes durante el periodo de confinamiento para el desove o durante el proceso de extracción de la sangre. Una situación similar se observó en varias especies de lenguado, en la trucha arcoíris, en el "goldfish" y en el arenque del Pacífico, en los cuales, después de la extracción de muestras de sangre, orina, y fluido seminal, se registraron concentraciones muy altas de cortisol y muy bajas del esteroide inductor de la maduración, aunque los organismos se encontraban sexualmente maduros (Scott y Canario, 1989).

El 17,20 β -P es el esteroide inductor de la maduración final, en truchas, salmones y ciprínidos, se ha detectado en altas concentraciones durante la maduración final de los ovocitos y la ovulación (Scott y Canario, 1987; Nagahama 1987). En algunos ensayos *in vitro* se ha mostrado frecuentemente como el más efectivo de los esteroides inductores de la maduración final en teleósteos. Sin embargo, en algunas especies, incluyendo a la sardina del

Pacífico es difícil para detectar este esteroide en el plasma de organismos maduros y hembras en estado de ovulación. Esto puede ser la consecuencia de uno o varios factores: el 17,20 β -P puede ser: a) metabolizado rápidamente de una forma no inmunológicamente activa; b) liberado sólo brevemente e intermitentemente; c) sintetizado y utilizado dentro del folículo ovárico (acción paracrina).

Una consideración adicional con respecto al EIM es que en la sardina del Pacífico se encontró una molécula diferente que también cumple esta función, el 17 α ,20 β ,21-trihidroxy-4-pregnen-3-one, y que se cuantificó en concentraciones mayores. Este esteroide inductor de la maduración del grupo C₂₁ se ha encontrado en otras especies como inductor de la maduración, por ejemplo, en *Micropogonias undulatus*, que sintetiza 17 α ,20 β ,21-trihidroxy-4-pregnen-3-one en el ovario (Trant, Tomas y Shakleton, 1986). En *Limanda limanda*, que sintetiza el 17 α ,20 α -dihidroxy-4-pregnen-3-ona (17,20 α -P) y 3 β ,17 α ,20 α ,trihidroxy-5 β -pregnane y en *Pleuronectes plateas*, que sintetiza 11-de-oxycortisol (17,21-P) y 3 α ,17 α ,21-trihidroxy-5 β -pregnan-20-ona (3 α ,17,21-P-5 β) (Canario y Scott,1990).

Los esteroides conjugados no se discuten en este trabajo, ya que al ser metabolitos de excreción, funcionan como feromonas y su función reproductiva está más relacionada con el cortejo (Van den Hurk y Resink, 1992). El proceso de conjugación resulta en la desactivación de los esteroides y en el incremento de su solubilidad en el agua. La glucuronización es un mecanismo común para la inactivación de esteroides y de otras moléculas y se ha demostrado que estos esteroides inactivos desencadenan fenómenos de atracción sexual en numerosas especies. En las hembras, los ovarios producen estos esteroides únicamente después de la ovulación y en los machos, la síntesis se lleva a cabo en las células de Leydig y las células de la vesícula seminal (Carrillo y Zanuy, 1993).

Finalmente, es importante destacar que el mayor porcentaje de las sardinas estudiadas antes de la exposición al régimen de luz y temperatura controlados, no alcanzó a completar su ciclo reproductivo, ya que sus ovarios estaban inmaduros. Durante la temporada de reproducción de *S. sagax caeruleus*, Claramunt (1999) observó hembras con ovarios en reposo y con ovocitos previtelogénicos. Por lo que es común encontrar en una población, un grupo de individuos que no alcanza la madurez gonadal, sin embargo no se cita el porcentaje de la población que se encuentra en ese estado.

VII. CONCLUSIONES

- La falta de efectividad en la inducción del desove pudo ser ocasionada por la heterogeneidad en el estado de madurez sexual, lo que se sumó al reducido número de la muestra de organismos estimulada y a la pequeña proporción de organismos maduros.
- El régimen artificial del fotoperiodo y la temperatura que experimentaron las sardinas en este estudio, promueve el desarrollo gonadal y estimula la maduración final.
- La inducción al desove con la administración de la dosis más alta con GnRHa no indujo al desove, pero si desencadenó el proceso de maduración final, que se evidenció por la migración de la vesícula germinal en el mayor porcentaje de las hembras analizadas.
- La cuantificación de esteroides sexuales sirvió para entender el efecto de la GnRHa sobre el desarrollo gonadal, sin embargo, las concentraciones de los esteroides estudiados fueron menores que los niveles basales, posiblemente como resultado del estrés en el que se encontraban los organismos.

VIII. RECOMENDACIONES

- Experimentar la maduración gonadal durante un ciclo anual con control de luz y temperatura para la sardina del Pacífico.

- Promover el desarrollo gonadal con el control integral de los factores ambientales que estimulen la sincronización de la ovulación y la espermiación de los reproductores en una misma temporada.

- Construir un perfil hormonal de un ciclo anual para entender el control del proceso reproductivo.

- Continuar el desarrollo de un protocolo para la inducción al desove.

- Diseñar y probar una dieta específica para los reproductores de la sardina del Pacífico.

IX. LITERATURA CITADA

- Abaunza P., Gordo L., Karlou-Riga C. Murta A., Eltink A. T. G. W., García-Santamaría M. T., Zimmermann C., Hammer C., Lucio P., Iversen S.A., Molloy J. y Gallo E. 2003. Growth And Reproduction Of Horse Mackerel, *Trachurus Trachurus* (Carangidae). *Reviews In Fish Biology And Fisheries*, 13: 27-61.
- Álvarez F. y Butler J. L. 1992. First Attempt to Determine Birthdates and Environmental Relationships of the Juvenile Sardine, *Sardina Pilchardus* (Walb.), In the Region of Vigo (Nw Spain) During 1988. *Bol. Inst. Esp. Oceanog.* 8:115-121.
- Ahlstrom, E. H. 1960. Synopsis on the biology of the Pacific sardine (*Sardinops caerulea*), p. 415-451. En: *Proceedings of the World Scientific Meeting on the biology of sardines and related species*. Vol. 3. FAO, Rome.
- Almansa, E., Pérez, M. J., Cejas, J.R., Badia, P., Villamandos, J. E., Lorenzo, A., 1999. Influence of broodstock gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) dietary fatty acids on egg quality and egg fatty acid composition throughout the spawning season. *Aquaculture* 170, 323–336.
- Baumgartner, T. R., A. Soutar, y V. Ferreira-Bartrina, 1992. Reconstruction Of The History Of Pacific Sardine And Northern Anchovy Populations Over The Past Two Millennia From Sediments Of The Santa Barbara Basin, California. *California Cooperative Fisheries Investigations Reports*, V. 33: 24-40.
- Baynes, S. M y A. P. Scott. 1985. Seasonal variations in parameters of milt production and in plasma concentration of sex steroids of male rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen Comp. Endocrinol.* 57 (1): 150-160.
- Bell, J. G., Farndale, B. M., Bruce, M. P., Navas, J. N., Carillo, M., 1997. Effects of broodstock dietary lipid on fatty acid compositions of eggs from sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 149, 107–119.
- Billard, R. 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod. Nutr. Develop.* 26: 877-920.
- Billard, R. 1987. Testis growth and spermatogenesis in teleost fish: The problem of the large interspecies variability in testis size.
- Borg, B. 1994. Androgens in teleost fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109C: 219-245.

- Breviario de la pesquería de peces pelágicos menores. Instituto Nacional de la Pesca. 73-96 pp.
- Briarty, L. G. 1975. Stereology methods for quantitative light and electron microscopy, *Sci. Prog.* 62:1-32.
- Bromage, N., 1998. Broodstock management and the optimisation of seed supplies. *Suisan Zoshoku* 46, 395– 401.
- Byskov AG. 1978. Follicular atresia. En: Jones RE (ed). *The vertebrate ovary*. Plenum Press, Nueva York. 533-562 pp.
- Brzuska, E. y J. Adamck. 1999. Artificial spawning of European catfish, *Silurus glanis* L.: stimulation of ovulation using LHRHa, ovaprim and carp pituitary extract. *Aquaculture Research* 30: 59–64.
- Callard, G. V. 1991. Spermatogenesis. In: *Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications*. Volume 4, Part A, Reproduction.
- Canario, A. V. M., Scott, A. P., y Flint, A. P. F. 1989. Radioimmunoassay investigations of 20 β -hydroxylated steroids in maturing/ovulating female rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 74, 77-84.
- Canario, A. V. M., y Scott, A. P. 1990. Identification of, y development of radioimmunoassay for, 17 α ,21-dihydroxy-4-pregnene-3,20-dione (11-deoxycortisol) and 3 α ,17 α -21-trihydroxy-5 β -pregnan-20-one in the ovaries of mature plaice (*Pleuronectes platesa*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 78, 273-285.
- Carrillo, M., y Zanuy, S. 1993. Fisiología de la reproducción: Fisiología de la reproducción de los Teleósteos. En "Acuicultura marina: fundamentos biológicos y tecnología de la producción". Coord. F. Castelló Orvay. Ed. Universitat de Barcelona. 125-142 pp.
- Chard, T. 1978. An introduction to radioimmunoassay and related techniques. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. T. S. Work y E. Work, Eds. North Holland Publishing Co. Amsterdam.
- Clark N. Frances. 1934. Maturity of the California Sardine (*Sardina caerulea*), Determined by Ova Diameter Measurements. *Fish Bulletin* No. 42: 1-49.
- Conover, D. O., Fleisher, M. H. 1986. Temperature-sensitive period of sex determination in the Atlantic silverside, *Menidia menidia*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43, 514–520.

- Cotero C. E. y H. Valles R. 2006. Reproducción de la Sardina *Sardinops sagax caeruleus* de la Costa Occidental de Baja California. Memorias del XIV Taller de Pelágicos Menores. La Paz, B. C. S. 21 al 23 de Junio.
- COSEWIC. 2002. COSEWIC assessment an update status report on the Pacific sardine *Sardinops sagax* in Canada. Comittee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. Ottawa. vii + 19pp.
- Crim, L. W., Peter, R. y Van der Kraak, G. 1987. The use of LHRH analogs in aquaculture. In: LHRH and its Analogs: Contraceptive and Therapeutic Applications, Part 2, Vickery, B.H. and Nestor, J.J., Jr. (eds.), MTP Press Limited, Lancaster, pp. 489-498.
- Cry, D. G. y Eales, J. G. 1996. Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine system in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 6: 165-200.
- Culley, M. 1971. The pilchard—biology and exploitation. Pergamon Press Limited. Oxford.
- Deriso, R.B., T.J. Quinn & P.R. Neal. 1985. Catch-at-age analysis with auxiliary information. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42: 815-824.
- Deriso, R. B., J. T. Barnes, L. D. Jacobson y P. Arenas. 1996. Catch-at-age analysis for Pacific sardine (*Sardinops sagax*), 1983-1995. *CalCOFI Rep.* 37: 175-187.
- De Vlaming, V. G. Grossman y F. Chapman. 1982. On the use of the gonadosomatic index. *Comparative Biochemistry and Physiology A, Comparative Physiology* 73:31-39.
- Dimmlich W. F., Breed W. G., Geddes M. y Ward T.M. 2004. Relative Importance of Gulf and Shelf Waters For Spawning and Recruitment of Australian Anchovy, *Engraulis Australis*, In South Australia. *Fisheries Oceanography*, 13:310-323.
- Evans, D. H. 1993. *The Physiology of Fishes*. CRC Press. E.U.A. 592 pp.
- Félix-Uraga, R., Quiñónez-Velázquez, C., Hill, T. Kevin, Gómez-Muñoz, V. M., Melo-Barrera, F. N. y García-Franco, W. 2005. Pacific Sardine (*Sardinops Sagax*) Stock Discrimination Off The West Coast Of Baja California And Southern California Using Otolith Morphometry. *CalCOFI Rep.*, Vol. 46: 113-124.

- Frimodt, C. 1995 Multilingual illustrated guide to the world's commercial coldwater fish. Fishing News Books, Osney Mead, Oxford, England. 215 pp.
- Fulton, T. 1902. Rate of growth of sea-fishes. Sci. Invest. Fish. Div. Scot. Rept., 1902.1-22.20:
- García, W. y R. F. J. Sánchez. 1997. Proyecto Pelágicos Menores: Boletín Anual de la Temporada. 1996. CRIP Ensenada. Informe Técnico del Instituto Nacional de la Pesca. (inédito).
- Garci-Crespo, R. R., M. M. Guzmán, A. P. Mora y A. Davidoff. 1982. Documento base para la elaboración del plan de acción del sector pesquero (1983-1985) (sardina y anchoveta). Programa de Investigación y Desarrollo Pesquero Integrado MEX/FAO (inédito).
- Grant, W. S., A. M. Clark y B. W. Bowen, 1998. Why restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA failed to resolve sardine (*Sardinops*) biogeography: insights from mitochondrial DNA cytochrome b sequences. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 55(12):2539-2547.
- Gunderson, D. 1993. Surveys of fisheries resources. John Wiley & Sons, Inc. NY. 248 pp.
- Guraya, S. S. 1986. The cell and molecular biology of fish oogenesis. In: Monographs in Developmental Biology, Volume 18, Sauer, H. W. (ed.) Karger, Basel, Switzerland. 1-223 pp.
- Hardy, R. 1985. Salmonid broodstock nutrition. In: Iwamoto, R., Sower, S. (Eds.), Salmonid Reproduction. University of Washington, Seattle. 98-108 pp.
- Harel, M., Tandler A. y Kissil, G. W. 1992 The kinetics of nutrient incorporation into body tissues of gilthead seabream *S. aurata* females and subsequent effects on egg composition and egg quality. Isr. J. Aquacult. Bamidgeh 44-127.
- Hargreaves, N.B., D.M. Ware y G.A. McFarlane. 1994. Return of the Pacific sardine (*Sardinops sagax*) to the British Columbia coast in 1992. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 51: 460-463.

- Heming, T. A., Buddington, R. K. 1988. Yolk absorption in embryonic and larval fishes. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Fish Physiology: Part A*, vol. XI. Academic Press, New York. 407–446 pp.
- Henderson N. E. 1962. The annual cycle in the testis of the eastern brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). *Canadian Journal of Zoology* 40:631-645.
- Hochachka Y Somero, 2002 Ivlev V.S. 1939. Balance Of Energy In Carps. *Zool. Zh.* 18: 303-318 P.
- Holden M. y D. Raitt. 1975. Manual de ciencia pesquera. Parte 2. Métodos para investigar los recursos y su aplicación. Doc. Téc. FAO pesca (115) Rev. 1, 21 pp.
- Izquierdo, M. S., Fernández-Palacios, H. y Tacon, A. G. J., 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* 197, 25– 42.
- Jalabert, B., Fostier, A., Breton, B. y Weil, C. 1991. Oocyte maturation in vertebrates In: *Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implication*, Pang, P.K.T. and Schreibman, M.P. (Eds.), Academic Press, Inc., San Diego, California. 23-90 pp.
- Jiménez-Tenorio N., Pozuelo, I., San Martín, M., Rodríguez de la Rúa, A., García, M. y Bruzón, M. A. 2005. La ovogénesis y espermatogénesis de la merluza, *Merluccius merluccius* como pasos fundamentales para su cultivo. Sociedad Española de Acuicultura, MAPA y UPV. X Congreso Nacional de Acuicultura. Sesión de Reproducción. Vol II: 486-487. Gandía (Valencia). 17-21 de octubre. Comunicación Oral. Libro de Resúmenes. Tomo I y II.
- Kah, O., Anglade, I., Lepréte, E., Dubourg, P., y de Mombrison, D. 1993. The reproductive brain in fish. *Fish Physiol. Biochem.*, 11: 85-98.
- Kawasaki, T. y A. Kumagai. 1984. Food habitats of the far eastern sardine and their implication in the fluctuation pattern of the sardine stock. *Bull. Jap. Sci. Fish.* 50: 1657-1663.
- Kime, D. E y I. P. Dolben. 1985. Hormonal Changes during induced ovulation of the carp *Cyprinus carpio*. *Gen Comp. Endocrinol*, 53 (3): 453.
- Le Gac, F., Blaise, O., Fostier, A., Le Bail, P. Y., Loir, M., Mourot, B. and Weil, C. 1993. Growth hormone (GH) and reproduction: A review. *Fish Physiol. Biochem.* 11: 219-232.

- Liley, N. R. and Rourger, Y. 1990. Plasma levels of gonadotropin and $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one in relation to spawning behaviour of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Biol., 37:699-711.
- López-Martínez, J. (1991). Alimentación de juveniles y adultos de sardine monterrey *Sardinops sagax caeruleus* (Girard), En el norte de Isla Tiburón durante el invierno de 1990. Tesis de maestría, CICESE, Ensenada, BC, México, 127 pp.
- Lluch-Belda, D., R. J. M. Crawford, 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 regime problem. S. Afr. J. Mar. Sci. 8: 195-205.
- Lluch-Belda, D., M.J. Arvizu, S. Hernández-Vázquez, D. Lluch-Cota, A.C.Z. Salinas, T. Baugartener, G. Hammann, V.A. Cota, C.E. Coteró, F.W. García, O. Pedrín, S.M. Lizárraga, M.A. Martínez, R. Morales, M.O. Nevárez M., J.P. Santos M., R. Ochoa B., S.R. Rodríguez, J.R. Torres V. & F. Páez B. 1995. Atlas Pesquero de México. Pesquerías Relevantes. Secretaría de Pesca/Instituto Nacional de la Pesca/Universidad de Colima (Cenedic).
- Lluch-Belda D., Magallon J.F. And Schwartzlose A.R. 1986. Large Fluctuations In The Sardine Fishery In The Gulf Of California: Possible Causes. Calcofi Rep. 27:136-140.
- Luquet, P., and Watanabe, T. 1986. Interaction "nutrition – reproduction" in fish. Fish Physiol. Biochem. 2, 121–129.
- MacCall, A. D. 1979. Population estimates for the waning years of the Pacific sardine fishery. CalCOFI
- Maes J., Limburg E.K., Putte A.V. And Ollevier F. 2005. A Spatially Explicit, Individual-Based Model To Assess The Role Of Estuarine Nurseries In The Early Life History Of North Sea Herring, *Clupea harengus*. Fisheries Oceanography,14:17.
- Mañanós, E.L., Zanuy, S. and Carrillo, M. 1997. Photoperiodic manipulations of the reproductive cycle of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and their effects on gonadal development, and plasma 17β -estradiol and vitellogenin levels. Fish Physiology and Biochemistry 16: 211-222,1997.

- Nagahama, Y. 1983. The functional morphology of teleost gonads. In *Fish Physiology, Volume IX, Part A*, Hoar, W. S., Randall, D. J. And Donaldson, E.M. (Eds.), Academic Press, Orlando, pp. 223-275.
- Nagahama, Y. 1997. 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, maturation-inducing hormone in fish oocytes: Mechanisms of synthesis and action. *Steroids* 62: 190-196.
- Nagahama, Y. 1994. Endocrine control of gametogenesis. *Int. J. Dev. Biol.*, 38: 217-229.
- Pang, P.T.K. and Schreibman, M.P. (eds.), Academic Press, Inc., New York, pp. 3003-341.
- Pankhurst, N.W. 1994. Effects of gonadotropin releasing hormone analogue, human chorionic gonadotropin and gonadal steroids on milt volume in the New Zelanda snapper, *Pragus auratus* (Sparidae). *Aquaculture*, 125:185-197.
- Parrish, J.D., R. Serra y W.S. Grant, 1989. The monotypic sardines, *Sardina* and *Sardinops*: their taxonomy, distribution, stock structure, and zoogeography. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46:2019-2036.
- Prat, F., Zanuy, S., y Carrillo, M. 2001. Effect of gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRHa) and pimozide on plasma levels of sex steroids and ovarian development in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*, 198:325-338.
- Perea M. A. y Buitrón D. B. 1996. Valores críticos en ovarios desovantes y en recuperación de la anchoveta (*Engraulis ringens*) y sardina (*Sardinops sagax*) en las épocas de desove. IMARPE. Inf. Prog. Inst. Mar Perú No. 44.
- Peter, R. E., Trudeau, V. L., Sloley, B. D., Peng, C., y Nahorniak, C. S., 1991. Actions of the catecholamines, peptides and sex steroids in regulation of gonadotropin-II in the goldfish. En *Proc. of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E., y Rolfe, M.S., Eds., University of East Anglia. Norwich, U.K. Fish Symp 91. Sheffield. 30-33 pp.
- Peter, R. E., Lin, H. R., van der Kraak, G. y Litte, M. 1993. Releasing hormones, dopamine antagonists and induced spawning. In *Recent advances in Aquaculture, Volume IV*, Muir, J.F. and Roberts, R.J. (eds.), Blackwell Scientific Publications, Oxford. 25-30 pp.

- Peter, R. y K. Yu. 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspect. *Fish and Biology* 7: 173-197.
- Plaza-Guido, Claramunt Gabriel and Herrera Gustavo. 2002. An intra-annual analysis of intermediate fecundity, batch fecundity and oocyte size of ripening ovaries of Pacific sardine *Sardinops sagax* in northern Chile. *Fisheries Science*. 68: 95-103
- Radovich, J. (1952). Food of the Pacific sardine, *Sardinops caerulea* from central Baja California and southern California. *Calif. Fish Game*, 39(4):575-585.
- SAGARPA. 2001. Programa Sectorial de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2001-2006. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. 104 pp.
- Shapiro, D.Y., 1988. Variation of group composition and spatial structure with group size in a sex-changing fish. *Anim. Behav.* 36, 140-149.
- Sivan, B. R. Vaiman, O. Sachs y I. Tzchori. 2004. Spawning induction and hormonal levels during final oocyte maturation in the silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture* 229: 419-431.
- Scott, A. P., Sheldrick, E., L. y Flint, A. P. F. 1982. Measurement of 17 α ,20 β -Dihydroxy-pregnen-3-one in Plasma of Trout (*Salmo gairdneri* Richardson): Seasonal Changes and Response to Samon Pituitary Extrac. *Gen. Comp. Endocrinol.* 46, 444-451.
- Scott, A.P., Mackenzie, D.S. y Stacey, N. 1984). Endocrine changes during natural spawning in the white sucker II. Steroid hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 56: 349-359.
- Saout, C., Y. M. Paulet y A. Duinker. 1999. Histological study on the early stages of oogenesis in *Pecten maximus*: a new approach with quantitative semithin histology. Bergen, Norway, 12th Inter. Pectinid Workshop. Pp. 129-130
- Specker, J. L. y Sullivan, C. V. 1994. Vitellogenesis in fishes: Status and perspectives. In: *Perspectives in Comparative Endocrinology*, Davey, K. G., Peter, R. E. And Tobe, S. S. (eds.), National Research Council of Canada, Ottawa, pp. 304-315.

- Sverdrup H. U., Johnson W. Martin y Fleming H. Richard. 1970. The Oceans. Their Physics, Chemistry and General Biology. Ed. Prentice-Hall, INC. 1087 pp.
- Swanson, P. 1991. Salmon gonadotropins: Reconciling old and new ideas. In: Proceedings of the Fourth International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E. and Rolf, M.S. (Eds.), Fish Symposium 91, Sheffield, pp. 2-7.
- Torres-Villegas JR. 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, 338 pp.
- Torres-Villegas JR, G. García, A Levy y RI Ochoa-Báez. 1985. Madurez sexual, peso promedio, proporción de sexos y frecuencia de desovantes de *Sardinops sagax* en el Golfo de California para noviembre de 1984. CIBCASIO Transactions 10: 536-549.
- Van Der Kraak, G., H. M. Dye, E. M. Donalson y G. A. Hunter. 1985. Plasma gonadotropina, 17β -estradiol, and $17\alpha,20\beta$ -Dihydroxy-pregnen-3-one levels during luteinizing hormone-releasing analogue and gonadotropin induced ovulation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Can J. Zool. 63: 824-833.
- Wolf, P. 1992. Recovery of the Pacific sardine and the California sardine fishery. CalCOFI Rep. 33: 76-86.
- Wu, C. H. y L. E. Lundy. 1971. Radioimmunoassay of plasma estrogens Steroids. 18 (1):91-111.
- Zanuy S. y Carrillo M. 1973. Estudio histológico del ovario de cabrilla (*Paracentro pristis cabrilla*) (L.) en relación con la ovogenésis. Inv. Pesq. 37 (1). 147-185 pp.
- Zar, J. H. 1984. Biostatistical analysis. 2nd Ed. Prentice Hall. Englewood Cliffs, NJ. USA: 334 pp.
- Zohar, Y. 1989. Fish reproduction: its physiology and artificial manipulation. En: SHILO, M. y Sarig, S. Fish Culture in Warm Water Systems: Problem and Trends. Florida, p. 65-119.

Zohar, Y. 1996. New approaches for the manipulation of ovulation and spawning in farmed fish. Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult. Suppl., 2: 43-48.

X. ANEXO

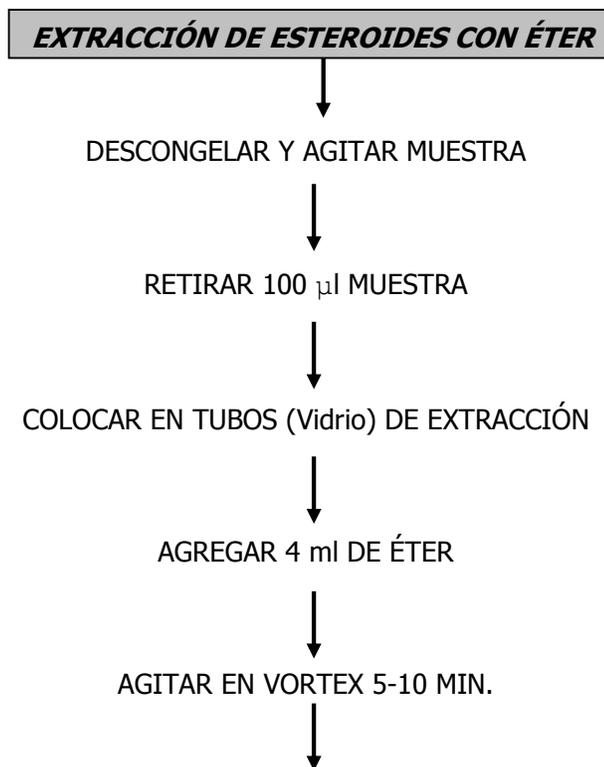
Anexo 1. Protocolo de preparación del stock Tampon Fosfato:

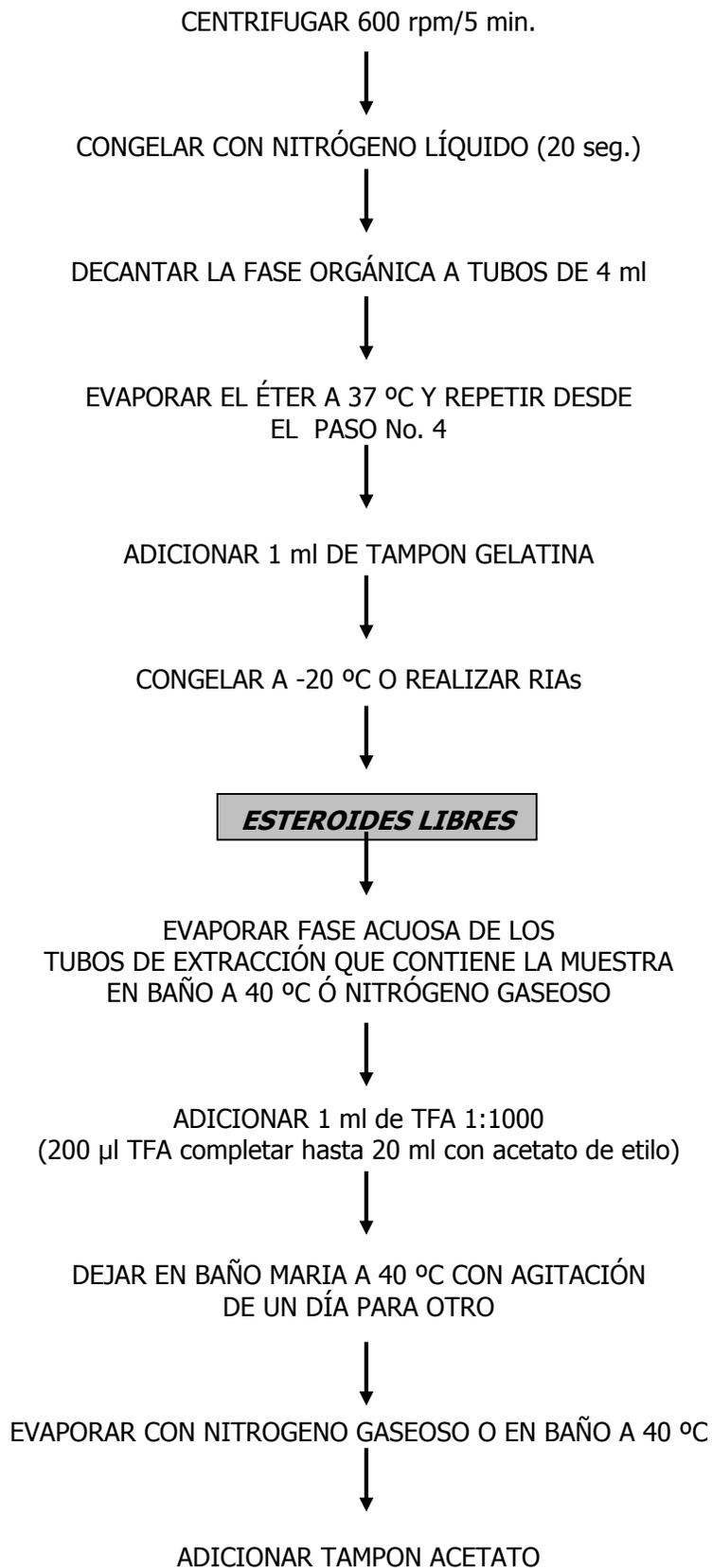
- Solución de 0.05 M, pH 7.6
 - 115 gr Na₂HPO₄
 - 29.6 gr NaH₂PO₄·2H₂O en 2 litros de agua

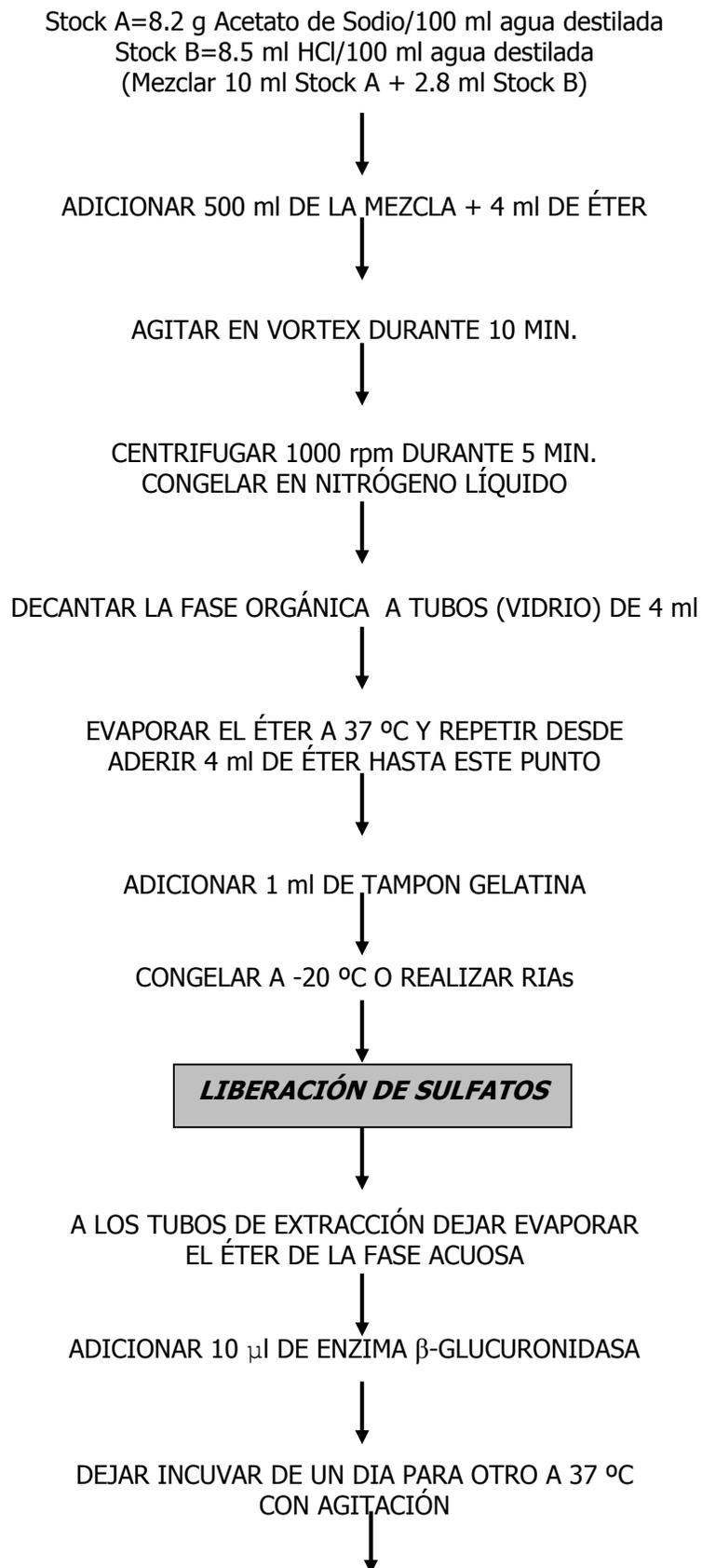
Anexo 2. Protocolo de preparación del stock Tampon Gelatina:

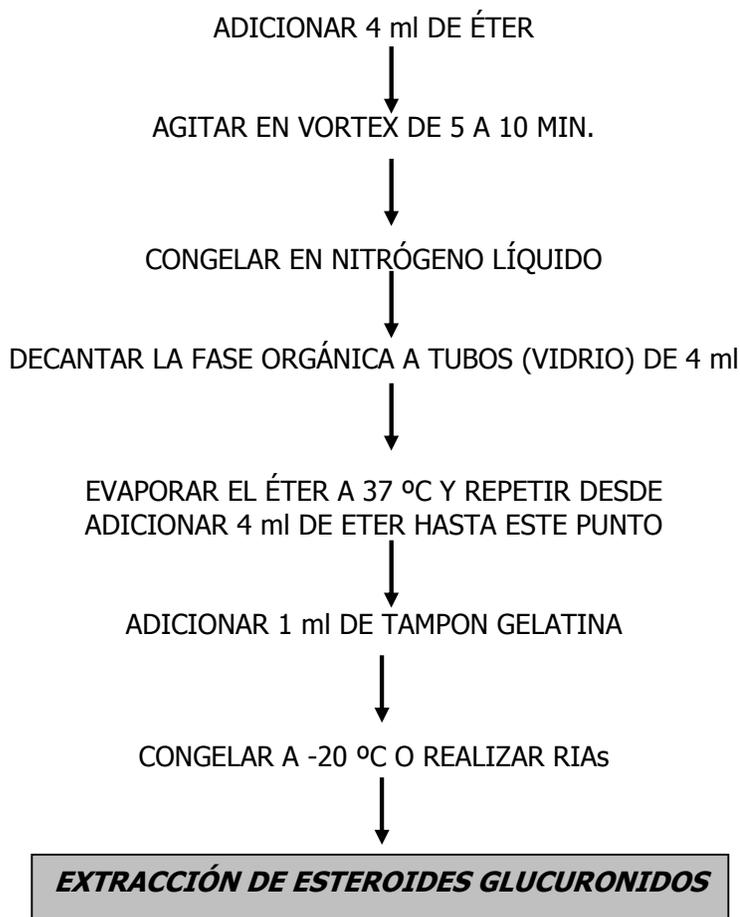
- 0.5 gr de Gelatina (Sigma ref° G-9382)
- 50 ml de Stock Tampon Fosfato y completar con H₂O destilada hasta los 500 ml.
- Adicionar 0.05 gr de acido de sodio.

Anexo 3. Extracción de esteroides con eter.









Anexo 4. Protocolo para cromatografía de capa fina (TLC):

- 1.** Se extrajo y colocó en tubos de vidrio un pool de 150 μ l de plasma para las hembras y otro para los machos.
- 2.** Se adicionó a la muestra de las hembras 17,20 β -P radioactivo y a la muestra de los machos estradiol radioactivo (5000 cpm) a cada muestra con el fin de determinar su recuperación. En otros 2 tubos se colocó esteroide normal para saber si está ya deteriorado.
- 3.** Se corrió TLC. Primeramente se realizó la preparación de la placa de silica usando una jeringa diclorometanol (nombre) (lavar de 3 a 4 veces), enseguida se adicionó en los tubos que contenían las

muestras de los diferentes esteroides 50 µl de diclorometanol, enseguida se agito tubo por tubo en un vortex por unos segundos, se sacó la muestra con la jeringa en dos etapas en la primera 50 µl y 30 µl en la segunda etapa y se colocó en la parte mas ancha de la placa. Se dejó secar por 5 min. Enseguida la placa se colocó en un vaso de vidrio de forma rectangular forrado con papel secante que contiene ya desde hace 40 minutos antes de colocar la placa 48 ml de cloroformo y 2 ml de etanol. La placa se deja sumergida en el vaso por 50 minutos y con tapa hermética.

- 4.** Este paso consistió en contar en el cromatograma (WIN-SCAN v1.6).
- 5.** Después se removieron fracciones de 0.5 cm de la placa de sílica hasta llegar a 26 fracciones (para recuperar el máximo de esteroide) se colocaron en puntas (5 ml) con algodón y eluyeron con diclorometanol/etanol a una relación 80:20 respectivamente para obtener el esteroide sin silica.
- 6.** Por último se realizaron los radioinmunoensayos (RIAs) correspondientes para cada esteroide problema.