

T
1160

AGN AGENCIA SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

124062



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

**"DESARROLLO OVÁRICO Y SU RELACIÓN CON LOS NIVELES HORMONALES
CIRCULANTES DE 17β -ESTRADIOL Y 17α -HIDROXIPROGESTERONA DURANTE
EL PRIMER CICLO REPRODUCTIVO EN HEMBRAS DE PEZ BLANCO, *Chirostoma
humboldtianum* VALENCIENNES 1835 "**

TESIS

Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biológicas
PRESENTA:
GUILLERMO ARTEMIO BLANCAS ARROYO

DIRECTOR DE TESIS:
DR. JOSÉ LUIS ARREDONDO FIGUEROA.

ASESORES:
DRA. IRENE DE LOS ÁNGELES BARRIGA SOSA.
DRA. MARÍA DEL SOCORRO RETANA MÁRQUEZ.

JUNIO 2007

Agradecimientos

Agradezco a toda mi Gran Familia por el apoyo y cariño que me dieron. Gracias.

Agradezco al todo el jurado por sus atinados comentarios que enriquecieron de manera sustancial mi tesis.

Agradezco a todas y cada una de las personas que de alguna manera contribuyeron en la realización de este trabajo.

Agradezco a la Doctora Xochitl Guzmán García del Laboratorio de Ecotoxicología, del Departamento de Hidrobiología de la UAM-Iztapalapa por su brillante asesoría y facilidades para que realizara el trabajo histológico de mi tesis.

Y agradezco a Dios.

Gracias

Guillermo

**EL JURADO DESIGNADO POR LA DIVISIÓN DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD DE LAS UNIDADES IZTAPALAPA
Y XOCHIMILCO APROBÓ LA TESIS QUE PRESENTÓ:**

GUILLERMO ARTEMIO BLANCAS ARROYO

El día 27 de junio de 2007.

JURADO:

DR. JOSÉ LUÍS ARREDONDO FIGUEROA

DRA. IRENE DE LOS ÁNGELES BARRIGA SOSA

DRA. MARÍA DEL SOCORRO RETANA MÁRQUEZ

DR. ANTONIO VALENCIA HERNÁNDEZ

DRA. REYNA FIERRO PASTRANA

El doctorado en ciencias biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana está en el padrón de excelencia de CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo bajo el convenio PFP-200-93.

El alumno Guillermo Artemio Blancas Arroyo, agradece la beca No. de Registro: 153056 proporcionada por CONACYT

PRINCIPALES ABREVIACIONES UTILIZADAS EN EL TEXTO.

AED = Análisis Exploratorio de Datos
E₂ = 17β-Estradiol
EMO = Estadio de Madurez Ovárica
EDF = Estados de Desarrollo Folicular
FP = Folículo primario
FS = Folículo secundario
FT = Folículo terciario
FV = Folículo vitelino
F = Filamentos
FM = Folículo maduro
FIM = Factor inductor de la maduración
GV = Glóbulos de vitelo
H-E = Hematoxilina- eosina tinción
HHG = Eje Hipotálamo Hipófisis Gónadas
HIM = Hormona inductora de la maduración
IG = Índices gonadosomático
IH = Índice hepatosomático
LO = Lamela o bolsa ovárica
O = Ovocele
PO = Pared Ovárica
PEV = Porcentaje de Espacio Visceral
RIA = Radioinmunoanálisis
VTG = Vitelogenina (proteína precursora de vitelo)
ZR = Zona radiada
17-P₄ = 17α-hidroxiprogesterona

Contenido

	pag.
RESUMEN	i
ABSTRACT	iii
INTRODUCCION	1
MARCO TEORICO	3
Taxonomía y descripción de la especie.	3
Reproducción del género <i>Chirostoma</i> .	5
Estructura general de las gónadas de peces teleósteos.	7
Ovarios.	7
Sistema neuroendocrino y la maduración sexual.	10
Hormonas Esteroides Sexuales Gonadales	13
Estimulación ambiental en la reproducción	16
Gametogénesis, ovogénesis y fases de desarrollo de los ovocitos	20
a) Crecimiento primario del ovocito.	22
b) Hidratación.	23
Clasificación empleada por Wallace y Selman (1990).	23
1. <u>Fase de cromatina nuclear</u>	24
2. <u>Fase perinuclear</u>	24
3. <u>Fase de alvéolo cortical</u>	24
4. <u>Fase vitelogenética</u>	24
5. <u>Fase de maduración</u>	25
6. <u>Ovulación.</u>	25
ANTECEDENTES	26
Reproducción de la especie <i>Chirostoma humboldtianum</i> .	26
Desarrollo ovárico del pez blanco <i>C. humboldtianum</i> .	27
Niveles hormonales en peces.	29
Estimulación ambiental para la reproducción.	31
JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	32
HIPOTESIS	33
OBJETIVOS	34
MATERIALES Y METODOS	35
Identificación de la primera edad y talla reproductiva.	36
Indicadores de Madurez gonádica y cálculo de los índices gonadosomática: (morfometría de los peces, evaluación de la madurez gonádica, índices gonadosomático (IG) y hepatosomático (IH).	39
Diseño de la Escala Empírica de Madurez Ovárica para peces blancos.	43

Estructura microscópica del ovario y descripción del proceso de la ovogénesis. Análisis histológico y composición folicular .	40
Evaluación de la concentración de las hormonas esteroideas: 17β - Estradiol (E_2), 17α , -hidroxi-progesterona ($17-P_4$).	41
RESULTADOS	47
Condiciones durante el experimento	47
Identificación de la primera edad y talla reproductiva.	48
Indicadores de madurez gonádica.	50
Escala Empírica de Madurez Ovária para peces blancos.	55
Análisis histológico del ovario, composición folicular y descripción del proceso de la ovogénesis.	56
Concentración de las hormonas esteroideas: 17β - Estradiol ($17E_2$) y la 17α , -hidroxi-progesterona ($17-P_4$).	69
DISCUSIÓN	75
Época reproductiva y primera edad reproductiva.	75
Indicadores de Madurez gonádica .	81
Estados de Madurez Ovária y construcción de una Escala Empírica para pez blanco	83
Histología ovária y ovogénesis.	85
Niveles circulantes de las hormonas: 17β - Estradiol (E_2) y la 17α , -hidroxiprogesterona ($17-P_4$).	92
CONCLUSIONES	98
LITERATURA CITADA.	101
ANEXOS	113
Fundamentos y descripción de las técnicas histológicas empleadas.	113
Radio Inmunoanálisis.	115
Carta de aceptación de la Publicación	
Publicación derivada de la tesis.	

Índice de tablas y figuras

Tablas.

Tabla 1. Resumen de hormonas sexuales encontradas en hembras de algunos peces Teleósteos.

Tabla 2. Concentraciones de 17β -estradiol y 17α , 20β dihidroxiprogesterona, circulante en algunos peces Teleósteos.

Tabla 3. Formato de la curva estándar, con 11 concentraciones tanto para la 17β -Estradiol (E_2) como para la 17α -hidroxiprogesterona ($17-P_4$), cuyo intervalo fue de 2 a 512 pg /tubo, empleadas en este análisis.

Tabla 4. Valores de los parámetros de calidad del agua evaluados durante la investigación.

Tabla 5. Datos sobre la composición de las tres cohortes experimentales, al inicio de la investigación.

Tabla 6. Número de ovodepositaciones y edad de los peces blancos a su primera y última puesta.

Tabla 7. Matriz de correlación de las variables morfológicas evaluadas en la época reproductiva. Con negritas se marcan las correlaciones significativas ($P \leq 0.05$).

Tabla 8. Matriz de correlación de las variables morfológicas evaluadas en la época de descenso. Con negritas se marcan las correlaciones significativas ($P \leq 0.05$).

Tabla 9. Criterios numéricos de identificación en los cuatro EMO propuestos, basados en los valores de IG y número de hembras en cada estadio, para temporada de ovodepositaciones y de descanso reproductivo.

Tabla 10. Escala empírica de madurez ovárica para los peces blancos.

Tabla 11. Biometría de los folículos en *C. humboldtianum*. Datos promedio y desviación estándar.

Tabla 12. Valores promedio y Desviación Estándar ($\pm$) de este porcentaje en cada Estado de Maduración Ovárica (EMO) durante la temporada de desoves del pez blanco *Chirostoma humboldtianum*.

Tabla 13. Niveles promedio de 17β -Estradiol (E_2), y de la progestina 17α -hidróxiprogesterona ($17-P_4$) circulantes, durante las épocas de reproducción y recuperación sexual, por Estado de Madurez Ovárica (EMO).

Figuras

Figura 1. Fotografía de un ejemplar hembra de pez blanco *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes, 1835) cultivado en la Planta Experimental de Producción Acuícola..

Figura 2. Diagrama general de un folículo desarrollado. El ovocito está rodeado por una capa acelular llamada zona radiada (ZR), y cubierta por la capa de células de la granulosa (G). La capa de las células de la teca (T), separada por una membrana basáltica (MB)). Tomado de Evans (1995).

Figura 3. Esquema de la regulación de la vitelogénesis en peces Teleósteos, donde se muestra la importancia del hígado en la síntesis de la vitelogenina. Tomado de Nagahama *et al.* (1995).

Figura 4. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas en peces teleósteos hembras. (FPM = Factor Promotor de la Maduración, $17-P_4$ = 17α -hidroxiprogesterona, $17\alpha 20\beta-P_4$ = $17\alpha 20\beta$ -dihidroxiprogesterona conocida como HIM = Hormona Inductora de la Maduración).

Figura 5. Esteroidogénesis gonadal. Metabolismo realizado *in vitro* en machos y hembras de la Familia Salmonidae y Cichlidae. Tomado de Baroiller *et al.* (1999).

Figura 6. Diagrama general del modelo de las dos células foliculares en Salmónidos, producción del 17β -estradiol y la $17\alpha, 20\beta$ -Dihidróxi-Progesterona (Nagahama, 1997).

Figura 7. a) Resumen de las relaciones visuales y la estimulación de la glándula pineal. B) Formación de la melatonina. (Tomado de Russel, 1998).

Figura 8. Ovodepositaciones de las hembras en los tres cohortes (triángulos negros = 12 meses; cuadros blancos = 11 meses y círculos negros = 10 meses) durante la época reproductiva (de enero 28 a agosto 15 de 2003).

Figura 9. Correlación entre los parámetros en base al logaritmo natural: $\ln l_t$ = logaritmo natural de la longitud total, $\ln p_t$ = logaritmo natural del peso total, $\ln p_g$ = logaritmo natural del peso de la gónada, $\ln p_h$ = logaritmo natural del peso del hígado y $\ln l_g$ = logaritmo natural de la longitud de la gónada; para la temporada reproductiva (A) y la de recuperación sexual (B).

Figura 10. Diagrama de cajas donde se muestran los valores de IG por estado de madurez ovárica propuesto.

Figura 11. Valores promedio del IG y IH durante la época de reproducción conforme a su EMO.

Figura 12. Valores promedio del IG y IH durante la época de descanso reproductivo conforme a su EMO.

Figura 13. Fotografías del ovario maduro de pez blanco, donde se muestra su posición en la cavidad visceral. Se observa como un saco bilobulado y pigmentado.

Figura 14. EMO I. Inmaduro.

Figura 15. EMO II. Madurez temprana.

Figura 16. EMO III. Crecimiento Ovárico.

Figura 17. EMO IV. Desove.

Figura 18. EMO IV. Pos-desove.

Figura 19. Arreglo estructural histológico del ovario del pez blanco *C. humboldtianum*, donde se observan folículos en diferentes Estadios de Desarrollo. Pared Ovárica (PO), Lamelas Ovilgeras (LO) y ovocele (O). Tinción Hematoxilina-Eosina (H-E).

Figura 20. Folículo fase vitelogenética avanzada del pez blanco (*C. humboldtianum*). Se observan células foliculares (CF), vesículas o lóbulos de vitelo (VV), Núcleo(N), nucleólos (Nu), y Filamentos (F). (H-E), 200X.

Figura 21. Se observa un folículo maduro (FM), en donde se aprecian las células somáticas que componen las capas foliculares: área de las células de la teca (T), área de las células de la granulosa. (G), lumen ovárico (LO), glóbulos de vitelo (GV) y folículo primario (FP). H-E, 500 X.

Figura 22. Diagrama de cajas donde se muestra la distribución de los datos del diámetro mayor medido en los folículos, por estadio de desarrollo.

Figura 23. Estados de maduración ovárica observados en *C. humboldtianum* (H-E). A) Estado I, inmaduro (500X), Barra = 38 μ : EG = Epitelio germinal, FP = Folículo primario; N = Núcleo; Nu = Nucleolos; FS = Folículo secundario; B) Estado II, maduración temprana (200X), Barra = 89 μ : A = Atrisia, FV = Folículos vitelinos; C) Estado III, crecimiento ovárico (32X), Barra = 600 μ : PO = Pared del ovario, FM = Folículos Maduros; D) Estado IV, en desove (32X), Barra = 600 μ y E) Estado V post-desove (200X), Barra = 89 μ .

Figura 24. Se muestran los folículos en estados vitelinos y maduros: tempranos (Vt), intermedios (Vi) y tardíos (VT), se aprecia de igual forma algunos maduros (FM). La barra = 500 micras HE, 32 x.

Figura 25. Representación esquemática del proceso de ovogénesis en el pez blanco *Chirostoma humboldtianum*, se observan los distintos estadios de desarrollo.

Figura 26. Perfiles histológicos (HE, 32X) y sus respectivos porcentajes de frecuencias por Estados de Desarrollo Folicular (EDF), en relación al EMO.

Figura 27. Niveles de promedio de 17β -Estradiol (E_2), y la 17α -hidróxi-progesterona ($17-P_4$). A) durante la época reproductiva; B) durante la de descanso, asociados al Estado de Madurez Ovárica (EMO)

Figura 28. Fluctuaciones de los niveles hormonales de $17-E_2$ y de $17-P_4$, por EMO (I, II, III, IV) y en ambas épocas.

RESUMEN

Los procesos reproductivos y su conocimiento son indispensables para lograr la reproducción controlada de especies difíciles de cultivar. Los peces blancos han sido una tradición en las pesquerías de aguas interiores y su permanencia se ha visto amenazada en algunos de sus hábitats naturales. El presente trabajo, tuvo como objetivo, describir el primer proceso de maduración sexual desde un punto de vista anatómico-funcional de hembras de pez blanco *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes). Se analizó el primer ciclo reproductivo de 50 hembras en condiciones de cultivo. Se describieron los estadios de desarrollo ovárico y los índices gonadosomático (IG) y hepatosomático (IH). Se realizó una descripción histológica de los ovarios y se informa por primera vez, niveles séricos del estradiol (E_2) y de la 17α -hidroxi $\rightarrow$ 4-pregnen-3-ona ($17-P_4$) por Radioinmunoanálisis. La primera época reproductiva tuvo una duración de seis meses y medio. Las hembras iniciaron sus desoves a la edad de un año. Se identificaron cuatro estadios de maduración ovárica (estadios I al IV) en la época de desoves y uno más (V) en la época no reproductiva, este último no tuvo un patrón de desarrollo definido. Los valores de los índices IG y IH mostraron una relación lineal positiva con el peso corporal únicamente en la época reproductiva ($r^2 = 0.74$ y $r^2 = 0.86$, $P \leq 0.05$, respectivamente). Se establece la Escala Empírica de Madurez Ovárica para las especies de peces blancos. El análisis histológico de los ovarios indicó que la especie se clasifica como sincrónica por grupos múltiples. Los primeros estadios de maduración gonadal fueron caracterizados por ovarios cuyas poblaciones foliculares estuvieron compuestas predominantemente por folículos pre-vitelinos. Conforme avanzó el proceso de maduración, se observaron todos los estadios de desarrollo folicular, con una tendencia al incremento de folículos vitelinos y maduros. Durante el estadio I, las concentraciones de las hormonas esteroides sexuales circulantes de estradiol (E_2) y de la 17α -hidroxi $\rightarrow$ 4-pregnen-3-ona ($17-P_4$) fueron altas (2.5 ± 0.7 ng/mL de E_2 y 2.4 ± 0.3 ng/mL de $17-P_4$), se observó un decremento durante el estadio II y los valores más altos se registraron en el estadio IV (7.6 ± 2.1 ng/mL de E_2 y 1.8 ± 0.9 ng/mL de $17-P_4$). Este mismo patrón fue observado durante la época de no desoves (ANDEVA $P < 0.05$); estos resultados son los primeros hallazgos en la fisiología reproductiva del pez blanco, los cuales sugieren una temprana actividad esteroidogénica en hembras inmaduras, además de que esta especie conserva su capacidad hormonal en la época pos-desove, sustentada en su composición folicular. Se concluye que como estrategia reproductiva, los machos

maduran a edades de nueve meses para asegurar la fertilización de los óvulos, y las hembras de mayor tamaño participan activamente en la actividad reproductiva. Por el gran desgaste metabólico que le infligen los múltiples desoves, presenta pausas en sus desoves pero en sus ovarios continúa el proceso de la ovogénesis y producción de hormonas sexuales. La capacidad de conservar su desarrollo ovárico, población folicular y niveles hormonales en la fase post-desove, pone de manifiesto su alta capacidad reproductiva de esta importante especie endémica de México. Lo anterior, contribuirá para comprender mejor los mecanismos involucrados en los procesos reproductivos y servirá de base para lograr su reproducción controlada y la obtención de huevos y larvas en condiciones de cultivo.

ABSTRACT

The first reproductive cycle of 50 females of the shortfin silverside, *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes) in indoor fishponds was analyzed. Ovarian developmental stages were described. The magnitude of gonadosomatic index (GI) and hepatosomatic index (HI) was estimated at different stages during the experiment. An histological description of the ovaries was done, and the quantification of serum levels of Estradiol (E_2) and 17 α -hydroxy-4-pregnen-3-one (17-P₄) by Radioimmuno Assay was made. The first spawning season lasted more than six months. Females began spawning at the age of one year. Four ovarian maturation stages (I to IV) were identified during the spawning season and an extra maturation stage was identified during the non-spawning season (stage V); The last stage showed no defined pattern of development. A positive linear relationship between body weight and both GI and HI was found during the spawning season only ($r^2 = 0.74$ and $r^2 = 0.86$; $P \leq 0.05$ for both indexes). The histological analysis of the ovaries showed that the species maturation pattern may be considered as multiple-group-synchronous. The follicular population showed reproductive activity during the first stages of maturation with a predominant population of pre-vitellogenic follicles. The presence of follicles in all developmental stages was always observed, but an increase in the number of vitellogenic and mature follicles was observed as the ovarian maturation increased. The concentration of circulating sexual steroid hormones of estradiol (E_2) and 17 α -hydroxy-4-pregnen-3-one (17-P₄) were high during stage I (2.5 ± 0.7 ng/mL and 2.4 ± 0.3 ng/mL for E_2 and 17-P₄, respectively); a decrease was observed during stage II, and the highest values were found in stage IV (7.6 ± 2.1 ng/mL for E_2 and 1.8 ± 0.9 ng/mL for 17-P₄). The same pattern was observed during the non-spawning season (ANOVA $P < 0.05$), which suggests an early oestrogenic activity in immature females, and that this species maintains its hormonal capacity during the post-spawning season, supported by their follicular composition. This are the first findings on the reproductive physiology of the shortfin silverside fish, which will allow a better understanding of the mechanisms involved in their reproductive processes, will improve their reproduction under culture conditions, and will enhance the production of eggs and larvae.

INTRODUCCIÓN

La reproducción sexual como fenómeno cíclico permite la transmisión de información genética de una generación a otra, la existencia de la diversidad biológica, y la perpetuación de las especies. Para que la reproducción tenga éxito, es preciso que se produzca una sincronización entre reproductores y las variaciones de los factores ambientales. Esta sincronización, permitirá que los individuos maduren simultáneamente en el momento adecuado para garantizar una mayor sobrevivencia de la progenie (Carrillo y Zanuy, 1993). Lo anterior cobra una gran importancia en el ciclo reproductivo de los peces Teleósteos, desencadenando cambios cíclicos en sus niveles hormonales, que se perciben en sus órganos reproductores, entre de ellos las gónadas. Así, cada individuo debe disponer de un sistema que reciba la información procedente tanto del exterior como del interior del mismo, que la integre y que determine el establecimiento de un estado endocrino idóneo, que regule a su vez, todos los eventos fisiológicos que conducirán a la reproducción. Estas complejas funciones se llevan a cabo a través de múltiples interacciones que tienen lugar a lo largo del eje cerebro-hipófisis-gónadas (Kah *et al.*, 1993).

La Acuicultura tiene como objetivos básicos, la reproducción de las especies de mayor interés socio-económico, la sobrevivencia y la mejora de la calidad de la progenie. En esta actividad se mantienen los peces en condiciones de cautividad, con el objeto de comercializarlos para su consumo o con la intención de incrementar la producción por encima de los niveles obtenidos en el medio natural. Sin embargo, por la falta de conocimiento de sus procesos reproductivos, en numerosas especies no se logra su reproducción durante el primer año de cautividad, probablemente como lo mencionan Matsuyama *et al.* (1991), se deba a la falta de síntesis y/o liberación de gonadotropinas en este periodo. El conocimiento de los mecanismos que regulan la función reproductiva en especies de interés, es por lo tanto, un requisito indispensable para su cultivo. Una vez adquiridos los conocimientos necesarios sobre el proceso reproductivo y su regulación en una especie determinada, será posible entender, lograr y manejar estrategias para su reproducción.

Introducción

El género *Chirostoma*, es el más representativo de la ictiofauna de las aguas interiores en México. Según Sánchez (1992), este género incluyen a los charales (de tallas pequeñas que alcanzan, como máximo, hasta 12 centímetros y 15 g en estadio adulto), y a los peces blancos (de tallas de más de 30 cm y entre 200 y 300 g en estadio adulto). La captura de peces del género *Chirostoma* ha representado históricamente una tradición en las pesquerías regionales de Michoacán, Jalisco y la Cuenca de México. Este género es un elemento endémico de nuestro país que está representado por 18 especies y seis subespecies, las cuales se distribuyen en el Altiplano, particularmente en la Meseta Central de la Republica Mexicana (Barbour, 1973 a y b).

Durante las últimas décadas, las poblaciones de charales y peces blancos se han visto amenazadas debido a la modificación de su hábitat original, a la sobrepesca, a la contaminación de los cuerpos de agua y a la introducción de especies exóticas o diseminadas. El charal y el pez blanco fueron consumidos durante la época prehispánica en la Cuenca de México, ya que junto con otras especies conformaban la fauna acuática representativa del Lago del Anahuac, particularmente, *C. humboldtianum* era conocido en la época prehispánica como *amilottl*, y era muy codiciado por su sabor. Después de la Conquista, se aceleró la modificación de las condiciones ambientales de esta zona lacustre y se alteró consecuentemente el hábitat natural, lo que resultó en la desaparición y extinción de algunas especies, en particular ésta especie, la cual, según los registros desapareció a principios de 1950 del Lago de Xochimilco, considerado el último reducto de esta especie en la Cuenca de México (Álvarez y Navarro, 1957).

Los estudios sobre *C. humboldtianum* son escasos, y persisten lagunas dentro del conocimiento, que no permiten su manejo controlado. A juicio del autor, es necesario contar con una visión integral anatómico–funcional del proceso reproductivo que permita diseñar mecanismos biotecnológicos para su cultivo, que ayude a lograr la reproducción controlada y sistemática en cautiverio, y además, que coadyuve a contribuir en el rescate, conservación y aprovechamiento de esta especie endémica de nuestro país.

MARCO TEÓRICO

Taxonomía y descripción de la especie.

El Orden Atheriniformes contiene seis familias, aunque en México se encuentran representadas solo dos: 1) Atherinidae, con dos géneros cuyas especies habitan zonas neríticas y estuarinas-lagunares del Golfo de México y 2) Atherinopsidae, que esta compuesta de 10 géneros: ocho en ambientes mixohalinos, oligohalinos e hiperhalinos de ambas costas del país, y dos más cuyas representantes endémicos están restringidas a varias cuencas lacustres de agua dulce del Altiplano Mexicano: *Chirostoma* Swainson 1839 y *Poblana* De Buen 1945 (Castro-Aguirre y Espinosa, 2006).

Según el criterio de Dyer y Chernoff (1996), La familia Atherinopsidae contiene a su vez dos subfamilias a) Atherinopsinae con dos tribus (cuyas especies son características de América del sur), y b) Menidiinae, con dos más: Menidiini y Membradini, las diversas especies que se encuentran en México pertenecen a los géneros *Chirostoma* como *Poblana*.

La especie *Chirostoma humboldtianum* (Figura 1), fue descrita por Valenciennes en 1834 (Barbour, 1973b), como *Atherinia humboldtiana*, pero poco después fue cambiada de posición taxonómica y utilizada como especie tipo del género por Swainson en 1839 (Paulo-Maya *et al.*, 2000).

Un aspecto interesante desde el punto de vista filogenético consiste en que se ubica a un grupo de peces del “tipo *humboldtianum*” como posible ancestro; el cual, daría origen a las diferentes especies de gran tamaño conocidas como peces blancos, entre los cuales se reconocen a cinco especies: *Chirostoma lucius*, *C. promelas*, *C. sphyraena*, *C. estor estor* y *C. humboldtianum*; lo anterior como producto de la especiación geográfica fomentada por la adaptación a los sistemas lacustres de la Meseta Central de México.

Aun existe la controversia, que queda por resolver, si *Chirostoma* debe ser considerado como sinónimo de *Menidia* (Rush *et al.*, 2005). Al respecto; Dyer y Chernoff (1996), aportaron evidencia de que *Poblana* y *Chirostoma* presentan un rasgo

sinapomórfico que no comparte con *Menidia*, la posición de la cintura pélvica ya que en *Chirostoma* se ubica a la altura de la quinta costilla pleural, mientras que para *Menidia* se localiza a la altura de la séptima costilla pleural.

Recientemente, Paulo-Maya (2004) aporta otra evidencia, y según este autor “debería considerarse como válida para el reconocimiento de *Chirostoma* como género diferente a *Menidia*, la diversificación del aparato mandibular que no tiene paralelo en *Mendía*, producto de un proceso evolutivo”.

Por lo anterior, en éste trabajo se ubica a ésta especie, en cuanto a las categorías supra-genéricas, por lo recomendado por Dyer y Chernoff (1996) y White (1985), y para las categorías infra-genéricas conforme a la clasificación de Barbour (1973b):

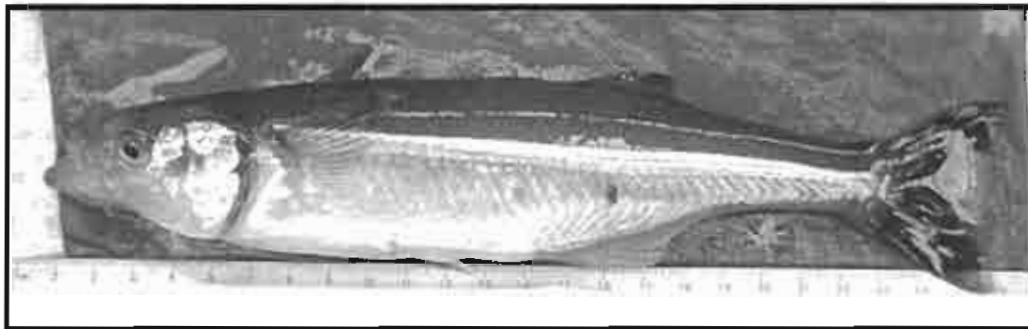


Figura 1. Fotografía de un ejemplar hembra de pez blanco *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes, 1835) cultivado en la Planta Experimental de Producción Acuícola.

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Grupo II: Gnathostoma

Superclase: Pisces

Clase: Osteichthyes

Subclase: Actinopterygii

Superorden: Teleostei

Orden: Atheriniformes (Rosen)

Familia: Atherinopsidae (Schultz)

Subfamilia: Menidiinae (Schultz)

Género: *Chirostoma* (Swainson)

Especie: *C. humboldtianum* (Valenciennes)

Sus características lo describen como un pez de cuerpo esbelto y comprimido, con una longitud máxima de 250 mm de longitud patrón (LP): boca sub triangular y más o menos oblicua, con la mandíbula superior ligeramente curva en su parte media; la mandíbula inferior se proyecta un poco por delante de la superior (Figura 1). Cuenta con 43 a 73 escamas en una serie longitudinal y de 25 a 40 escamas predorsales. Posee de 19 a 28 branquiespinas a lo largo del primer arco branquial. La distancia del hocico al origen de las aletas pélvicas es de 40.9 a 51.2% de la LP, la longitud postorbital es de 12.2 a 16.8% LP. La distancia orbital de 4.6 a 7.8% LP, el hocico 8.4 a 13.4% LP y la base de la aleta anal 17.1 a 22.2% LP (Paulo-Maya *et al.*, 2000).

Reproducción del género *Chirostoma*.

Los estudios sobre la biología del género *Chirostoma*, se desarrollan separadamente desde hace tres décadas. En especial, los que se refieren a aspectos reproductivos en cautiverio, abocadas principalmente a dos especies de pez blanco *Chirostoma estor estor* y *C. lucius* de los lagos de Pátzcuaro y de Chapala, respectivamente (Sasso *et al.*, 1997; Paulo-Maya *et al.*, 2000).

La reproducción de estas especies, fue motivo de diferentes investigaciones. Dentro de las recientes, se encuentran las llevadas a cabo en la Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo en el Estado de Michoacán (Martínez-Palacios *et al.*, 2002), los realizados en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN) México (Moncayo *et. al.*, 1983 y 2003; Figueroa *et. al.*, 1999 y 2004; Ramírez, 2006), y las desarrolladas en la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa (UAM-I) con el pez blanco (*Chirostoma humboldtianum*) (Blancas, 2002; Blancas *et. al.*, 2003 y 2004); estas y otras investigaciones, ofrecieron un panorama más amplio en el conocimiento de los procesos reproductivos del pez blanco.

Al respecto, se sabe que los peces del género *Chirostoma*, en condiciones naturales presentan una conducta reproductiva de cortejo, en la cual, las hembras y los

machos llegan a zonas someras donde encuentran poco oleaje y buena oxigenación. Después de que la hembra libera los óvulos maduros, el macho deposita el semen para fertilizarlos, el cual al contacto con el agua "se activa" incrementando su motilidad. Los huevos poseen de uno a nueve filamentos o estructuras adherentes también conocidas como zarcillos, y el número varía dependiendo de la especie. Estos zarcillos, se desarrollan al final de la ovogénesis, y les sirven para anclarse a las plantas acuáticas o a cualquier sustrato sumergido, como son rocas, troncos, raíces y macrofitas (Sánchez, 1992; Jiménez y García, 1995; Sasso *et al.*, 1997; Paulo-Maya *et al.*, 2000; Blancas, 2002 y Blancas *et al.*, 2004; Ramírez, 2006).

Existe la controversia de cuantas temporadas reproductivas se presentan al año en estas especies. Se reporta por ejemplo, que para el charal blanco *Chirostoma grandocule*, se observan dos épocas o temporadas reproductivas separadas; la primera representa una intensa que abarca de enero a mayo, y es en el mes de marzo cuando el Índice Gonadosomático (IG) alcanza su valor más alto (7.78); para después descender notoriamente. La segunda época menos intensa que la primera, presenta valores de IG variables y no concluyentes, puesto que se reportan datos que varían desde 3.84 hasta 6.78 en la época reproductiva y posteriormente este valor desciende gradualmente y finalmente, en el mes de diciembre se reporta un nulo desarrollo de las gónadas; lo anterior coincidiendo con condiciones ambientales de menor temperatura y fotoperiodo propio de esa época (Sánchez, 1992). Existen evidencias de que en algunas especies del género, solo se tiene un solo periodo de reproducción. Es el caso del charal *Chirostoma attenuatum* del lago de Pátzcuaro (Rojas 2006); para este organismo se reporta la presencia de hembras maduras desde enero hasta el mes de septiembre y de machos maduros, durante casi todo el año. Lo anterior permite suponer que estos peces tienen un amplio periodo reproductivo, prácticamente de todo el año, con una etapa de mayor intensidad en los meses de abril y mayo. Estas observaciones coinciden con lo que reportó Peralta (1991), para otras especies de Aterinópsidos en este mismo lago.

La biología reproductiva de estos peces, indica que todas las especies de pez blanco son ovíparas y ovodepositan a lo largo del año, con variaciones en la intensidad relacionadas con la época anual y el clima. Paulo-Maya *et al.* (2000) y Sasso *et al.* (1997), describieron para estos organismos, una amplia época reproductiva desde noviembre

hasta mayo y de enero a agosto respectivamente; con variaciones dependiendo del cuerpo de agua. En la "Presa Huapango", en el Estado de México, se registraron hembras maduras todo el año, pero se observa un pico reproductivo de marzo a agosto, y durante la fase de invierno, el ciclo reproductivo se encuentra en estado de recuperación del desove anterior y la replicación de células sexuales (Moncayo *et al.*, 1983). Informes recientes, indican una ausencia de organismos maduros durante los meses de noviembre, diciembre y enero, y mencionan que el pez blanco inicia el desove en el mes de febrero el cual se acentúa conforme se incrementa la temperatura del agua (Blancas, 2002 y Blancas *et al.*, 2004; Ramírez, 2006).

Estructura general de las gónadas de peces Teleósteos.

El origen embrionario de las gónadas en los peces, se inicia en un primordio gonadal simple o doble, que se desarrolla a partir de un epitelio peritoneal y que corresponde al cortex de otros vertebrados. Las gónadas están constituidas por dos tipos de células, las germinales que corresponden a los espermatozoides en los machos y a los óvulos en las hembras; y las células somáticas como son las células de Leydig y Sertoli en los machos y las células foliculares para las hembras. Estas células somáticas, tienen las funciones de alimentación, de sostén, y sirven de comunicación entre ellas y las células germinales. Por lo regular, las gónadas son pareadas, alargadas y adheridas a la parte dorsal del mesenterio en la región posterior del cuerpo. Estas se extienden hacia atrás, alargándose y estrechándose formando los conductos, ya sea el oviducto en hembras o los conductos espermáticos en machos, que terminan en el poro genital, propiedad característica de los peces Teleósteos, denominándose como gónadas de tipo cistovárico (Takashima y Hebiya, 1995).

Ovarios.

La pared del ovario, en peces los Teleósteos, está formada de una capa delgada de tejido conjuntivo y de músculo liso, las células germinales se encuentran en las lamelas ovigeras con tejido conjuntivo de colágeno elástico y bastante vascularizado. Su estructura anatómica y funcional básica, son los folículos ováricos parecidos en la

mayoría de las especies. El ovocito en desarrollo está ubicado en el centro del folículo, rodeado por células foliculares (Takashima y Hibiya, op cit.).

La cubierta de células foliculares, generalmente consiste en una sola capa interna homogénea de células de la granulosa y una o dos capas exteriores heterogéneas de células de la teca. Las capas de la teca y la granulosa están separadas por una membrana. Entre la superficie del ovocito y la capa de las células de la granulosa, hay una capa acelular denominada la zona radiada (ZR). Se presentan microvellosidades tanto en el ovocito como en las células de la granulosa, que penetran en la zona radiada y son denominados como canales de unión; además, se ha identificado en los folículos áreas citoplasmáticas conectadas entre las células de la granulosa y el ovocito. Estos canales de unión tienen una función metabólica entre las células de la granulosa y el ovocito y pueden estar involucrados en la transferencia de nutrientes y mensajes químicos o factores que controlan el desarrollo del ovocito, en los que también intervienen las células de la teca, por estar conectadas de igual forma con las células de la granulosa (Figura 2) (Wallace y Selman, 1981; Takashima y Hibiya, 1995).

Los peces pueden ser agrupados conforme a su estrategia reproductiva, inicialmente fueron clasificados por Wallace y Selman (1981) conforme al patrón de desarrollo en los ovarios y posteriormente por Gorbman (1983) (*fide*: Evans, 1995). Estas modalidades se fundamentan en el patrón de desarrollo de los ovocitos y se ve reflejado por el número de puestas por ciclo que presentan las especies por lo que pueden ser ubicados como sincrónicos, sincrónicos por grupos y asincrónicos.

Conforme lo anterior, el término también denominado desove/ovulador sincrónico distingue del desove/ovulador asincrónico, en que en estos últimos los huevos son reclutados en más de dos ocasiones en la temporada reproductiva. En el patrón de los sincrónicos, también llamados sincrónicos estrictos, todos los ovocitos presentan el mismo estado de desarrollo, ejemplo de ello son los peces Salmónidos como *Salmo trutta*, *Oncorhynchus kisutch* y *O. gorbuschs*, que presentan un solo evento ovulatorio en la época reproductiva (Dye *et al.*, 1986).

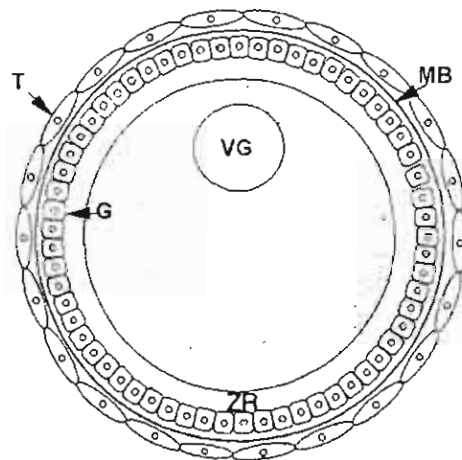


Figura 2. Diagrama general de un folículo desarrollado. El ovocito está rodeado por una capa acelular llamada zona radiada (ZR), y cubierta por la capa de células de la granulosa (G). La capa de las células de la teca (T), separada por una membrana basáltica (MB). Tomado de Evans (1995).

En los peces con desarrollo sincrónico por grupos, se distingue en el ovario dos o más estados de desarrollo de los ovocitos. Estos peces, tienen varios eventos ovulatorios inducidos por ejemplo por estaciones lunares o ciclos diurnos. Los ovocitos más avanzados serán agrupados en el ovario para la próxima puesta.

Finalmente, los ovarios con patrones asincrónicos, contienen ovocitos en todos los estados de madurez, característico de peces con múltiples ovulaciones en una larga época reproductiva.

La Clasificación de Pankhurst (1998), es la única clasificación en la que se incluye el desarrollo de las células gaméticas masculinas, basándose en el patrón reproductivo de la hembra, siendo ésta -a mi juicio- la más completa y preciosa.

Las especies semélparas que son aquellas que desovan una sola vez y mueren como las anguilas o los salmones, solamente presentan un grupo de ovocitos maduros dentro del ovario, por lo tanto se considera un ovario con desarrollo sincrónico. Las especies que desovan más de una vez en su vida se llaman iteróparas. Dentro de estas se ubican los peces que desovan solamente una vez en cada época reproductiva y se

clasifican como sincrónicos por grupos y en ellos encontramos dos poblaciones de células gaméticas, pre-vitelogénicas y vitelogénicas, que son los destinados a desovar en esa época reproductiva; la trucha (Tyler, 1991) y algunas especies marinas de aguas profundas y especies marinas de latitudes altas, son ejemplos de este grupo de peces (Pankhurst, 1998).

Existen otras especies que desovan varias veces dentro de una misma época de reproducción y se denominan sincrónicos por grupos múltiples; en el ovario se encuentran varios grupos de ovocitos madurando; es el patrón más común de desarrollo en los Teleósteos tropicales y de agua templada tanto marinos como de agua dulce (Moyle y Cech, 2000) y también, para algunas especies de agua fría (Pankhurst y Conroy, 1988). Existe también, una clasificación realizada por Wallace y Selman (1981), que define un desarrollo asincrónico en donde se encontrarían todos los tipos celulares dentro de la gónada como en *Pagrus auratus* que ovula diariamente durante la época reproductiva que dura varios meses, pero realmente el patrón de desarrollo es sincrónico por grupos múltiples (Pankhurst y Carragher 1991).

Sistema neuroendocrino y la maduración sexual.

La reproducción en peces Teleósteos, como en otros vertebrados, está controlada por ritmos biológicos endógenos (Munro, 1990), y es un proceso complejo, que demanda una coordinación fisiológica, la cual a su vez, esta regulada por hormonas secretadas por el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas (HHG) y estimulada por factores ambientales por ejemplo: el fotoperiodo y la temperatura, los cuales son detectados por órganos sensoriales (Redding y Patinño, 1993), los que transmiten esta información a el hipotálamo, que es el mayor centro de integración del cerebro, provocando un cambio en la liberación de algunos neurotransmisores como la serotonina (Kham y Thomas, 1992) y el ácido γ -aminobutírico (GABA) (Trudeau y Peter, 1995), en núcleos hipotalámicos específicos.

Los neurotransmisores, por medio de neuronas neurosecretoras hipotalámicas, modulan la síntesis y secreción, de un decapeptido llamado: Hormona Liberadora de las Gonadotropinas (GnRH – por sus iniciales en inglés), las cuales a su vez, regulan la

secreción en la hipófisis de dos hormonas glicoprotéicas, las gonadotropinas I y II (GtH I y GtH II respectivamente) (Peter *et al.*, 1990). Otras formas de GnRH han sido identificadas en otras regiones del cerebro en Teleósteos y probablemente tienen diferentes funciones (Gothif *et al.* 1995). Rutas metabólicas inhibitorias (Factores Inhibitorios de la Liberación de las Gonadotropinas GRIFs), por ejemplo los dopaminérgicos, también están presentes en los peces Teleósteos (Goos *et al.* 1987; Peter *et al.* 1991; Trudeau y Peter, 1995). Ambas rutas metabólicas, se sirven de terminales nerviosas que estimulan directamente en las células secretoras de la hipófisis (gonadotropos), las cuales tienen la función de regular la secreción de las GtH I y GtH II. Cuando la GnRH, se une a receptores celulares específicos en los gonadotropos, activan a segundos mensajeros como la fosfo-inositol calcio-dependiente y posiblemente a otros sistemas de transducción que finalmente estimulan la liberación de las gonadotropinas (Chang y Jobin, 1994). Las dos gonadotropinas son liberadas a la circulación en respuesta a la estimulación del GnRH, y por medio de receptores específicos, estas son captadas por las gónadas de los peces, para estimular la producción de hormonas esteroides sexuales y la inducción de la gametogénesis, desarrollo folicular, la ovulación o espermiación y finalmente la liberación de los gametos.

Mediante diversas líneas de investigación, se ha sugerido, que la GtH I, controla los estados tempranos del ciclo reproductivo en Salmónidos, mientras que la GtH II esta involucrada principalmente en eventos como la maduración de los gametos, ovulación y desove. Esto ha sido mostrado en diferentes especies de Salmónidos por los niveles circulantes elevados de la GtH I durante el crecimiento de los ovocitos y espermatogénesis, detectando en estos momentos niveles bajos niveles de la GtH II (Young *et al.*, 1983; Swanson, 1991).

Posteriormente, Van Der Kraak y Wade (1994), confirman lo anterior al reportar que los incrementos significativos de GtH II acompañan la etapa final de maduración y espermiación y al mismo tiempo se aprecia un decremento de la otra gonadotropina. Actualmente se acepta que la GtH I de los peces corresponde a la FSH de tetrápodos, mientras que la GtH II corresponde a la LH (Querat *et al.*, 2000).

Las gonadotropinas en Teleósteos una vez que se han unido a sus receptores específicos en células de las gónadas o esteroidogénicas activan diferentes rutas de segundos mensajeros, particularmente los sistemas de la adenilato ciclasa y del calcio, parecen ser mediadores intra-celulares de importancia entre la respuesta final en gónadas y las gonadotropinas (Patiño, 1997; Van Der Kraak, 1992).

La principal función del estradiol (E_2), es regular la producción de la vitelogenina (VTG) (proteína precursora de vítelo) y de las lipoproteínas por parte del hepato-páncreas (Figura 3). La ruta fisiológica indica que a través del sistema vascular se transporta el estradiol producido principalmente por los folículos, el cual actúa en el hígado para la producción de vitelogenina (como un ejemplo de una retroalimentación positiva); esta vitelogenina es transportada de igual forma por el torrente sanguíneo e incorporada al ovocito por pinocitosis; el estradiol disminuye cuando termina la vitelogénesis (Nagahama *et al.*, 1995).

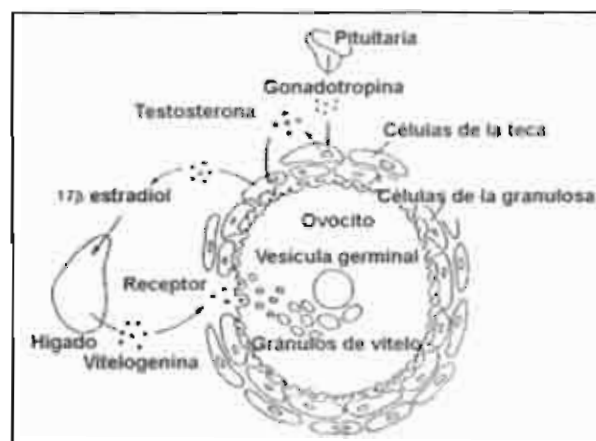


Figura 3. Esquema de la regulación de la vitelogénesis en peces Teleósteos, donde se muestra la importancia del hígado en la síntesis de la vitelogenina. Tomado de Nagahama *et al.* (1995).

Por otro lado el E_2 circulante interviene en la regulación positiva y negativa de la secreción de las gonadotropinas a nivel de la hipófisis y en la formación y liberación del GnRH en el hipotálamo, en ambos casos se sirven de receptores de esteroides en estas regiones del cerebro de los peces (Figura 4). Por ejemplo, los andrógenos: T y 11-KT tienen una función importante en la regulación de la espermatogénesis. En hembras, después de que el crecimiento del ovario y el desarrollo de los ovocitos se ha completado,

los niveles de 17β - estradiol declinan en muchas especies de Teleósteos y cuando las condiciones son favorables para que las hembra ovo-depositen, se incrementan los niveles de la gonadotropina de la maduración (GtH II), lo cual provoca una activación de otro proceso esteroidogénico, la síntesis y liberación de la hormona inductora de la maduración (HIM), reconocida como la $17\alpha,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona ($17\alpha,20\beta P_4$) y en muchas especie la $17\alpha,20\beta,21\alpha$ -trihidroxi-4-pregnen-3-ona ($17\alpha,20\beta,21\alpha P_4$), las que finalmente estimulan bioquímicamente la formación de proteínas que son llamadas en su conjunto Factor Promotor de la Maduración (FPM) o factor inductor de la maduración (FIM) (Figura 4). (Young *et al.*, 1982; Kagama *et al.*, 1984; Nagahama, 1987; Smith y Thomas, 1990; Swanson, 1991; Yoshikuni y Nagahama, 1991; Redding y Patiño, 1993; Thomas, 1994; Kobayashi *et al.*, 1996; Patiño, 1997; Devlin y Nagahama, 2002).

Hormonas Esteroides Sexuales Gonadales.

El proceso fisiológico reproductivo de los peces Teleósteos es similar a la mayoría de los vertebrados. La actividad esteroidogénica de las gónadas está regulada, como ya se mencionó, principalmente por las gonodotropinas GtH I y GtH II (Figura 4). Sin embargo, otras hormonas y factores gonadales como no-gonadales, participan también en ésta regulación (Young y Nagahama, 1983; Aida, 1988).

En los peces sexualmente inmaduros, probablemente los esteroides desempeñan un papel importante en la diferenciación de las gónadas y otros tejidos que tendrán como resultado final el dimorfismo sexual. En peces maduros, en cambio, las hormonas sexuales intervienen directamente en la misma gónada y lo hacen a nivel de sus células sexuales y somáticas, regulando los procesos de la ovogénesis, y de la ovulación, así como también en la acción de desove; mientras que en los machos regula la espermatogénesis y la emisión y espermiación del semen. Particularmente, en las hembras, los estrógenos y las progestinas regulan las fases de la vitelogénesis y maduración respectivamente. Los andrógenos pudieran también regular la ovogénesis. Fitzpatrick *et al.* (1987), encontraron que en el salmón de la especie *Oncorhynchus kisutch*, la concentración de la testosterona en la sangre, está estrechamente relacionada

con la maduración en las hembras, al aparecer en los estadios tempranos de la maduración de los ovocitos (Tabla 1).

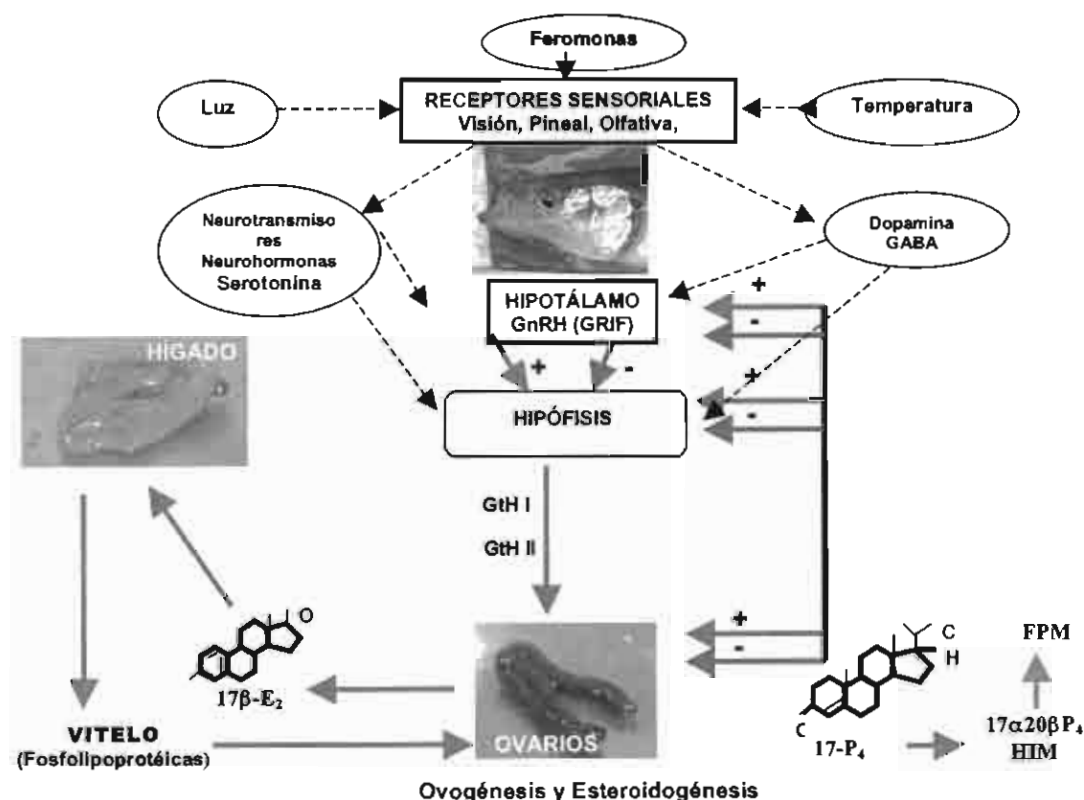


Figura 4. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas en peces teleósteos hembras. (FPM = Factor Promotor de la Maduración, 17-P_4 = 17α -hidroxiprogesterona, $17\alpha,20\beta\text{-P}_4$ = $17\alpha,20\beta$ -dihidroxiprogesterona conocida como HIM = Hormona Inductora de la Maduración).

Los testículos y los ovarios de los peces son capaces de sintetizar una variedad de moléculas esteroides que regulan diversas funciones (Figura 5), además del sistema endocrino sexual, la expresión de algunas características sexuales secundarias y conductuales y metabolismos en general (Fostier *et. al.*, 1983, *fide* Evans, 2000).

En el ovario, los sitios primordiales de síntesis de esteroides son las células de la teca y las de la granulosa en los folículos ováricos. Estas células producen 17β -estradiol (E_2), Estrona (E_3), y la testosterona (T), la progesterona (P_4), la 17α -hidroxil-4-pregnen-3-

ona (17-P_4), la $17\alpha,20\beta$,dihidroxi-4-pregnen-3-ona ($17\alpha,20\beta\text{P}_4$), la $17\alpha,20\beta,21\alpha$ -trihidroxi-4-pregnen-3-ona ($17\alpha,20\beta,21\alpha\text{P}_4$), entre otras hormonas esteroideas. Este proceso esteroidogénico, varía dependiendo de la especie y el estado de desarrollo ovárico (Fostier *et. al.*, 1983) (Tabla 1).

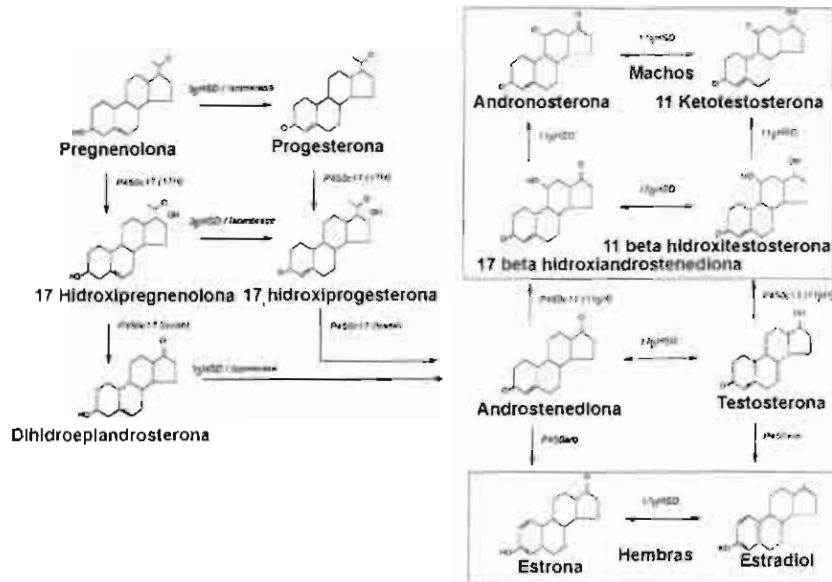


Figura 5. Esteroidogénesis gonadal. Metabolismo realizado *in vitro* en machos y hembras de la Familia Salmonidae y Cichlidae. Tomado de Baroiller *et al.*, (1999).

Tanto los estrógenos como los andrógenos en los peces, son metabolizados mediante su conjugación con otras moléculas, usualmente glucorónidos. Los esteroides conjugados se tornan así como metabolitos inactivos disponibles o para ser guardados como reserva, para su posible reactivación y, en virtud de convertirse en compuestos altamente solubles, son excretados en la orina en algunas especies tienen una función de feromona para comunicarse con otros peces antes del evento del desove (Borg, 1994).

Nagahama (1997), al trabajar con Salmónidos, define que la HIM la $17\alpha,20\beta$ -Dihidroxi-Progesterona ($17\alpha,20\beta\text{P}_4$), es producida cuando la gonadotropina (GtH-II) interactúa con la membrana del ovocito y estimula a nivel de la capa de las células de la teca la síntesis de su precursor la 17α -Hidroxi-Progesterona (17-P_4), la cual a su vez, atraviesa de la membrana basal para llegar a las células de la granulosa. La estimulación

de la GtH II activa la síntesis *de novo* de la 20 β -hidroxideshidrogenasa, la que finalmente, actúa y metaboliza el FIM, tomando como sustrato la 17-P₄ (Figura 6). Estos investigadores, detallan los mecanismos moleculares, donde se explica la formación del Factor Promotor o Inductor de la Maduración (FPM ó FIM, respectivamente), que es un complejo de proteínas activas que denominan cdc2 Kinasa y la ciclina- β , que finalmente son responsables de la maduración del ovocito. Este proceso de maduración consiste en la desaparición de la Vesícula Germinal (fusión con la membrana del ovocito en el polo animal), la condensación del cromosoma y la liberación del primer cuerpo polar.

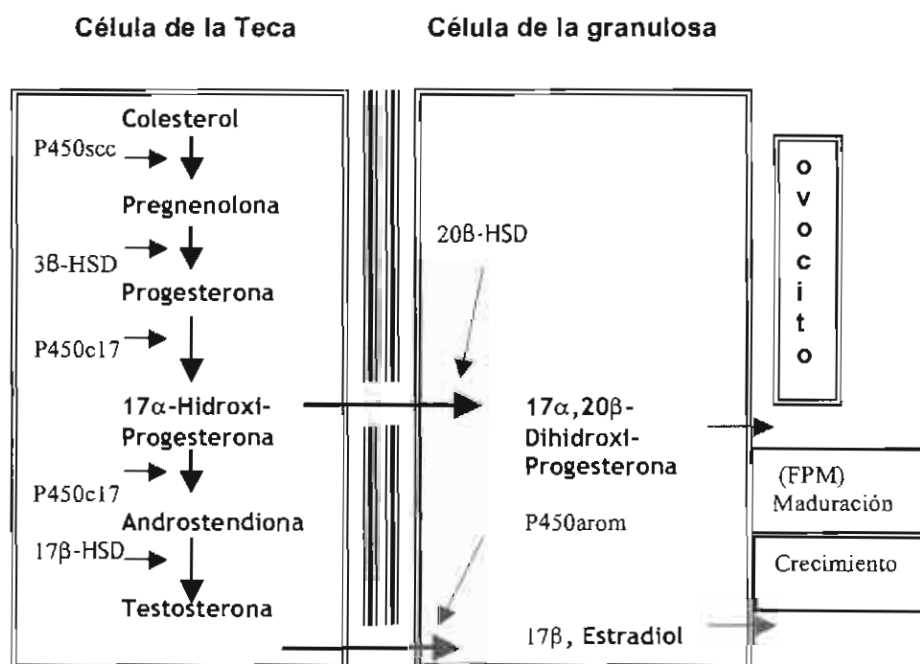


Figura 6. Diagrama general del modelo de las dos células foliculares en Salmónidos, producción del 17 β -estradiol y la 17 α ,20 β -Dihidróxi-Progesterona (Nagahama, 1997).

Estimulación ambiental en la reproducción.

Evidencias en fisiología reproductiva de los peces registradas (Aída, 1988; Munro, 1990, Evans 1995; Moyle y Cech, 2000) subrayan que: los procesos reproductivos de los peces, están controlados de forma endógena por un ritmo o reloj biológico y son estimulados por los cambios ambientales, sobre todo por la temperatura y la luz. Se sabe

además, que *"la reproducción en peces (maduración, cortejo y desove) sigue patrones rítmicos correlacionados fuertemente con los ciclos estacionales de luz, temperatura del agua y suministro de alimento principalmente"* (Arredondo et. al., 1993).

Tabla 1. Resumen de hormonas sexuales encontradas en hembras de algunos peces Teleósteos.

Hormonas no esteroides	Hormonas esteroides
Hormona Liberadora de las Gonadotropinas (GnRH)	Testosterona: T
Gonadotropinas GtH I	11- Ketotetosterona 11-KT
Gonadotropinas GtH II	Androstendiona
	17 β - estradiol E ₂
	Estrona E ₃
	Progesterona P ₄
	17 α -hidroxiprogesterona 17-P ₄
	17,20 β -dihidroxiprogesterona 17-20 β -DiP ₄
	17,20 β ,21 α -trihidroxiprogesterona 17,20 β ,21-P ₄

Otros factores tales como la atracción entre los reproductores por el efecto sus feromonas, el cortejo por parte del macho, la disponibilidad de alimento rico en lípidos (importante en la fase de vitelogénesis), entre otros, estimulan de igual forma el desarrollo y la maduración gonádica (Van Oordi y Goos, 1987; Borg, 1994).

Los trabajos de Bergland (1995) y Davies y Bromage (1995), indican que sobre todo la temperatura del agua es determinante en el proceso final en la maduración de las células sexuales. Estos últimos, señalan que *"en la trucha arco-iris (Oncorhynchus mykiss) un incremento significativo de horas luz después del desove, induce un aumento en el nivel de gonadotropinas séricas de GtH I, con el advenimiento consecuente del proceso de vitelogénesis pronunciado"*.

El proceso de percepción de los estímulos ambientales en peces Teleósteos es similar a los demás vertebrados. En los peces, los factores exógenos como el fotoperiodo y la temperatura, son percibidos por vía órganos sensoriales de la piel, ojos y receptores de temperatura, afectando el metabolismo de la glándula pineal. Esta información, es transmitida al cerebro por las células transductoras, quién a su vez, la procesan y evalúan. En la base del cerebro, el hipotálamo convierte las señales nerviosas en información química, como consecuencia, el hipotálamo segrega hormonas peptídicas conocidas como reguladoras de gonadotropinas GnRH a la hipófisis, este proceso se

conoce como neurosecreción. Como ya se mencionó, dichos factores estimulan a los gonadotrofos a nivel de la hipófisis anterior y así se activa en cascada los procesos endocrinos de la reproducción (Weil, 1992; Moyle y Cech, 2000).

La glándula pineal, que es una estructura pequeña y redonda situada en la superficie superior del tálamo, entre los hemisferios cerebrales, y que se deriva embriológicamente como una excrescencia del cerebro; participa en la fisiología reproductiva de los peces y es la responsable de secretar la hormona melatonina, un metoxi-indol sintetizado a partir de triptófano, que es convertido en 5-hidroxi-triptamina (serotonina). La serotonina es acetilada en el grupo amino y se añade un grupo metilo al grupo 5-hidroxi por la transferasa hidroxindol-O-metil, una enzima encontrada únicamente en la glándula pineal. La enzima es estimulada por la noradrenalina (NA), liberada por los extremos terminales de los nervios simpáticos que se extienden hasta la glándula pineal, desde un ganglio simpático cervical. La luz que incide en la retina inhibe la síntesis de melatonina, y la oscuridad la estimula, por la glándula pineal. Un pequeño nervio, el conducto óptico accesorio inferior, pasa desde el nervio óptico a través del procéncéfalo medio, y se une con el sistema nervioso simpático. La secreción pineal inhibe las funciones ováricas (Figura 7 a y b) (Falcón, *et al.*, 1996).

Los efectos de la melatonina, en la función del eje hipotálamo hipófisis, se pueden observar, cuando se aplica esta hormona y los niveles de LH y FSH disminuyen en mamíferos (Russel, 1998). Los mecanismos implicados, involucran la participación de neurotransmisores como la norepinefrina (Lin y Peter, 1996). Particularmente en los peces, la estimulación de factores ambientales, regulan los mecanismos reproductivos vía la estimulación o inhibición del eje HHG, así es demostrado principalmente con trabajos con salmón del Atlántico y algunos Cíclido (Bhattacharya y Banerje, 1988; Bromage y Cumaranatunga, 1988).

La nor-epinefrina (NE), es un neurotransmisor que tiene una amplia distribución en el hipotálamo y en ciertas zonas del sistema límbico y que interviene activamente en el proceso de intercomunicación sinápticas entre las neuronas largas, las cuales envían un estímulo a través de ésta neurosecreción de NE, la que encuentra sus receptores en los pinealocitos, desencadenando la síntesis de melatonina; la cual actúa a tres niveles de

hipotálamo, para inhibir la secreción del GnRH, además de actuar en la adenohipófisis en la liberación de las gonadotropinas, con un efecto aún no bien conocido de inhibición directa a las gónadas.

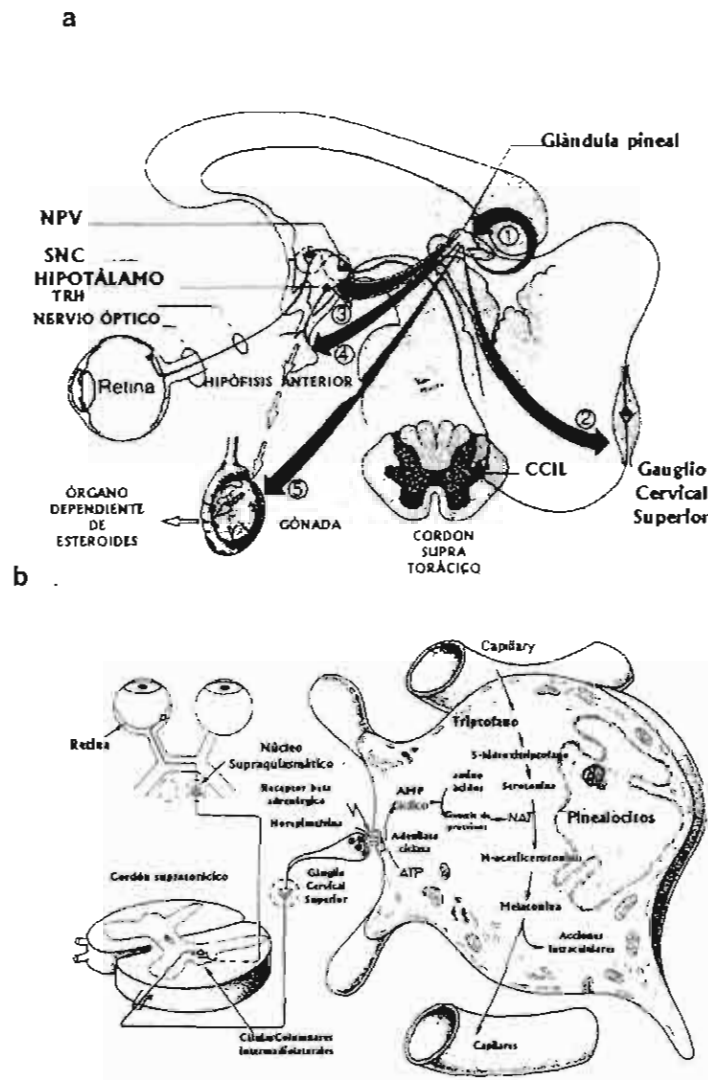


Figura 7. a) Resumen de las relaciones visuales y la estimulación de la glándula pineal, b) formación de la melatonina (Tomado de Russel, 1998).

Importantes avances en la manipulación e inducción ambiental a la ovulación, sobre todo en especies difíciles de reproducir en cautiverio, han sido reportados en las

dos últimas décadas impulsadas por el uso de Gonadotropinas sintéticas y el uso GnRH (Mylonas *et al.*, 1998 y Mylonas y Zohar, 2001).

Gametogénesis, ovogénesis y fases de desarrollo de los ovocitos.

La gametogénesis se refiere a los procesos de: proliferación mitótica, división meiótica y diferenciación de células germinales primordiales diploides que dan como resultado la formación de las "gonias" y finalmente a la formación de los gametos maduros haploides. Los procesos de espermatogénesis y ovogénesis son significativamente diferentes en ciertos aspectos. La meiosis es un proceso in-interrumpido durante la espermatogénesis, a diferencia la ovogénesis se interrumpe en dos ocasiones durante el desarrollo del ovocito. Otra diferencia consiste en que el espermatocito normalmente decrece de tamaño durante la meiosis, el ovocito en cambio, en muchas especies como los peces, crece significativamente durante este periodo. Una más consiste en que: la etapa final de maduración del espermatozoide ocurre después de la meiosis, mientras que para el ovocito madura cuando ocurre este proceso de división celular. Finalmente, mientras que cada espermatogonia da origen a cuatro gametos masculinos, cada ovogonia produce solamente un óvulo funcional. (Evans, 1995).

La ovogénesis en todos los vertebrados, es el proceso donde una célula germinal (ovogonia), se transforma en ovocito durante la meiosis. El primer arresto miótico ocurre en la profase I y el ovocito se desprende del mismo durante esta etapa de maduración, para que posteriormente en la metafase II, caiga en el segundo arresto miótico. El ovocito maduro u óvulo es aquel que está listo para ser fertilizado. Sale del segundo arresto miótico y finaliza la segunda división de la meiosis con el estímulo de la fertilización (Evans, *op cit.*).

Etimológicamente hablando, la ovogénesis, es el origen del ovocito; sin embargo, en ocasiones el término es utilizado para definir la formación completa de un óvulo. La ovogénesis implica el procedimiento que origina al ovocito. En Teleósteos, la literatura sugiere que los ovocitos derivan en etapas tempranas del desarrollo embrionario en los peces del epitelio germinal. El proceso de la ovogénesis, inicia hasta el momento que las ovogonias se encuentran en un ambiente adecuado que le proporciona el epitelio

germinal en la gónada, la cual a su vez comienza también con su desarrollo después de haberse diferenciado (Wallace y Selman, 1990). Grier (2000), definen que la ovogénesis sucede cuando la ovogonia entra en división meiótica y por lo tanto da origen a un ovocito leptoténico. El proceso es precedido por la replicación de DNA y el inicio de la condensación de los pares de cromosomas homólogos (inicia la primera división meiótica). Se corrobora por lo tanto, que esta fase ocurre cuando el ovocito aún se encuentra en el epitelio germinal, lo que implica que las ovogónias y el ovocito meiótico son las dos células germinales que encontramos en el epitelio germinal ovárico. En imágenes electrónicas, las ovogonias se pueden distinguir por su ubicación en el epitelio germinal de las bolsas ovígeras, llamadas también lamelas ovígeras; éstas ovogonias por su forma ovalada y con su material cromosómico predominante en todo el ooplasma, es muy frecuente confundirlas por lo tanto con ovocitos en estado temprano de crecimiento. En los Teleósteos, las ovogonias generalmente miden menos de 10 μ en diámetro y son visibles generalmente con microscopía electrónica de transmisión y de barrido (Tyler y Sumpter, 1996).

Las definiciones utilizadas para definir al folículo en peces Teleósteos, han evolucionado. Selman *et al.*, (1986), describieron una capa folicular múltiple que consiste en un ovocito que se encuentra rodeado por células foliculares, un basamento basal (lamina basal), una capa vascularizada de células de la teca, la cual contiene una serie de capilares y una capa epitelial, Tyler y Sumpter (1996), omiten esta membrana basal en su definición de folículo. Redding y Patiño (1993), incluyen la membrana basal, pero no la capa de epitelio superficial. Grier (2000), confirma que no hay consistencia en las definiciones publicadas para describir al folículo ovárico en los peces Teleósteos.

Todas las definiciones, que describen la teca como parte inicial del folículo ovárico difieren con la aplicada para los mamíferos. Como ejemplo: el compartimiento que presentan los ovarios en los peces (lamelas o sacos ovígeros) y el origen tanto de los ovocitos como de las células foliculares. En los peces, los ovocitos se originan del epitelio germinal luminal y las células de la teca se originan en el espacio extravascular dentro del estroma ovárico. La agrupación por lamelas ovígeras, por otro lado, había sido reconocida desde los trabajos de Nagahama (1983), donde además al referirse a la foliculogénesis, este investigador, destaca que los elementos del tejido conectivo del estroma son los

responsables de formar las capas de la teca en Salmónidos. Wallace y Selman (1990), confirma que las células que originan al folículo derivan del compartimiento epitelial del ovario, no así las células de la teca.

La foliculogénesis, comienza cuando la ovogonia se convierte en ovocito meiótico. Estos empiezan a descender desde la superficie del epitelio germinal y se asocian con células epiteliales que constituyen las células pre-foliculares. La foliculogénesis es completada cuando el ovocito y éstas células pre-foliculares son envueltas completamente por una membrana basal y separadas del epitelio germinal. Posteriormente, las células pre-foliculares se convierten en células foliculares (Grier, 2000). Durante la foliculogénesis, el ovocito pasa por los estados, de leptoteno, zigoteno y paquitenio y entra en una prolongada fase de diploteno de la primera profase meiótica. En este periodo, se suscitan una serie de cambios citoplasmáticos y un crecimiento significativo (el mayor crecimiento se experimenta en la fase de vitelogenética), particularmente, aparecen múltiples nucleolos por la formación y acumulación de RNA en el citoplasma, caracterizado por una apariencia de material granular denso, visto solo por microscopía electrónica.

Durante el proceso de la ovogénesis, se experimentan muchos cambios, uno de ellos y posiblemente el más tangible es el crecimiento que experimenta el folículo durante el desarrollo sexual de acuerdo a lo siguiente:

a) Crecimiento primario del ovocito. El estado inicial del crecimiento primario del ovocito está caracterizado por una intensa síntesis de RNA, durante esta fase ocurre una actividad intensa de transcripción de éste material genético, pero con cambios cualitativos poco visibles a la microscopía de luz. Por estas características, suele llamarse a los ovocitos con estas características como: ovocitos en estado de Cromatina Nuclear. El mayor cambio citoplasmático observable será el crecimiento que experimenta éste y la formación del cuerpo balbiano (Guraya, 1979 citado en Grier, 2000), el cuerpo balbiano es un complejo compuesto de una población heterogénea de organelos citoplasmáticos, incluyendo mitocondrias cuerpos multivesiculares, retículo endoplasmático y elementos de Golgi.

Durante la fase de crecimiento primario, los ovocitos de los teleósteos crecen considerablemente de tamaño por ejemplo en la trucha arco-iris durante esta fase, el ovocito incrementa su diámetro de 10-20 μ a 100-200 μ (Nagahama, 1983; Tyler y Sumpter, 1996). Durante la fase de crecimiento primario, una envoltura acelular vitelina se desarrolla alrededor del ovocito, esta capa envuelve a la célula germinal y se convierte en lo que conocemos como: zona radiada, zona pelúcida o corión (Bromage y Cumaranatunga, 1988).

La zona pelúcida esta formada por dos o cuatro grandes proteínas, las cuales son sintetizadas por el propio ovocito en algunas especies, aunque se tienen referencias que pudieran ser sintetizadas por el hígado estimulado por el estradiol (Oppen- Bersten *et al.*, 1991). En este estado de crecimiento primario, el crecimiento normal del ovocito está fuertemente marcado por la migración de múltiples nucléolos a la periferia del nucleoplasma. La meiosis es detenida en el estado diploténico, aunque la diferenciación de la pared folicular continúa. Se inicia una gran actividad de producción de ARN ribosomal, cuerpos plasmáticos se hacen evidentes, como algunas vacuolas, el cuerpo Balbiano va desapareciendo, esto es reconocido por algunos autores como la fase perinuclear (Wallace y Selman 1990).

Posteriormente continúa el proceso de la ovogénesis con una etapa muy característica en los peces, la fase o estado de la vitelogénesis, la de maduración y finalmente, una que ha recibido poca atención la de hidratación.

b) Hidratación. Después de la ovulación y antes del momento de la ovodepositación el ovulo sufre una fase de crecimiento muy significativo, debido a la captación de agua, lo cual representa en ocasiones crecimiento hasta de un 50% de su volumen final (Wallace y Selman, 1990).

Clasificación empleada por Wallace y Selman (1990).

La descripción del proceso de desarrollo de la foliculogénesis, ha sido descrita por varios investigadores, la clasificación comúnmente empleada para peces Teleósteos, se basa en la descripción y reconocimiento de varias fases como la de crecimiento,

cromatina nuclear, cromatina perinuclear, la fase de alvéolo cortical, vitelogenésis, fase de maduración y finalmente la ovulación. Wallace y Selman, describieron detalladamente estos estados de desarrollo, donde presentan seis etapas secuenciales. Grier (2000), propone clasificaciones aún más finas, subdividiendo algunas etapas. Sin embargo, al tratarse de un proceso continuo, estas clasificaciones podrían motivar alguna confusión al describir el número de estadios de desarrollo, a continuación se describen estas fases:

1. Fase de cromatina nuclear. En ella se aprecia que los ovocitos en esta fase se encuentran en profase de la primera división meiótica (los que corresponde al leptoteno y paquiteno, tiempo donde se sintetiza activamente el RNA). En un análisis microscópico, muestra cromosomas condensados (donde posteriormente se dará la replicación de material genético). Pueden ser observados en el núcleo los cromosomas "plumosos". Se reporta que en esta fase inicia la formación de estructuras como el complejo de Golgi y el cuerpo vitelino Balbiano.

2. Fase perinuclear. El crecimiento normal del ovocito está fuertemente marcado por la migración de múltiples nucléolos a la periferia del nucleoplasma. La meiosis es detenida en el estado diploténico, aunque la diferenciación de la pared folicular continúa. Se inicia una gran actividad de producción de RNA ribosomal, cuerpos plasmáticos se hacen evidentes, como algunas vacuolas, el cuerpo balbiano va desapareciendo.

3. Fase de alvéolo cortical. Se observa al microscopio esta estructura en el citoplasma, de igual forma se aprecian gotas de aceite que circundan a la vesícula germinal. Un evento relevante ahora es la formación de micro vellosidades y de la envoltura vitelina, además se van desarrollando las capas foliculares, se presenta un estado previtelogenético (vitelo génesis endógena), durante la cual la talla aumenta por la acumulación centrípeta dentro del citoplasma de vesículas de residuos glicoprotéicos, aumentando la basofilia como evidente etapa anterior a la vitelogenésis por lo general.

4. Fase vitelogenética. Se caracteriza por la acumulación centrífuga de vitelo, grandes moléculas fosfolipoprotéicas sintetizadas por el hígado, las cuales circulan por el torrente sanguíneo, éstos glóbulos de vitelo dirigen a las vesículas glicoprotéicas hacia la periferia del citoplasma de la célula, las cuales darán protección al embrión dentro del

huevo. Así mismo, se incrementa la complejidad de la pared folicular, se desarrollan las envolturas vitelinas, formando capas que han sido nombradas como Z1, Z2 y Z3; las que a su vez, presentan una comunicación con la pared folicular a través de microtúbulos que servirán para el transporte de hormonas esteroides producidas por la teca y la granulosa. En algunas especies, se inicia ahora la migración de la vesícula germinal al polo animal.

5. Fase de maduración. La reanudación visible de la migración de la vesícula germinal al polo animal, caracteriza a esta fase. Al llegar esta a su destino, se disuelve con la pared del ovocito y finaliza la primera división meiótica. Funcionalmente, se presenta una importante interacción de las capas foliculares con el ovocito respecto a las hormonas sexuales. La actividad esteroidogénica por células foliculares (en la teca, granulosa y en las intersticiales), se hace patente, por la presencia de gran cantidad de la enzima 3β - HSDH (hidroxiesteroide-deshidrogenasa)

6. Ovulación. La expulsión del ovocito maduro del folículo, por medio de la ruptura de la capa folicular, se conoce como ovulación. En esta fase, al igual que en la anterior se detecta una importante actividad hormonal.

Pérez (2006), emplea terminología sencilla y más precisa para describir el proceso de foliculogénesis, utiliza las definiciones de folículos primarios, secundarios y terciarios, los cuales se designan a los estados previtelinos descritos (fases de cromatina nuclear, perinuclear y alveólo cortical, respectivamente); para los estados vitelinos y maduros los define como folículos vitelinos y maduros, respectivamente. Dicha clasificación fue empleada en la presente investigación, basado en el principio de que la unidad anatómica funcional del ovario son los folículos.

ANTECEDENTES

Reproducción de la especie *Chirostoma humboldtianum*.

La mayoría de los informes del ciclo reproductivo para la especie *Chirostoma humboldtianum*, coinciden al informar que la temporada de desoves tiene lugar en la primera mitad del año —de enero a julio—, con tiempos de intensa actividad que van de marzo a junio-julio (Flores, 1985; Palacios-Saucedo, 1998; Gonzáles-Barajas, 2002; Cárdenas, 2003). Las observaciones en condiciones de cultivo en esta especie, destacan una sola temporada reproductiva la cual inicia en el mes de febrero y concluye hasta el mes de agosto (Blancas 2002; Blancas *et al.*, 2003 y 2004). Actualmente persiste la controversia, de si los peces blancos presentan solo una amplia temporada de desoves, o bien, si su actividad reproductiva anual está compuesta por dos periodos, el primero de ellos intenso y significativo.

Para estos peces, el régimen de temperatura del agua que impera durante las sus épocas de desove varía según la localidad geográfica, oscilando entre los 17 y 24°C; el desove ocurre en días con más de 11 horas de luz (Sasso *et al.* 1997; Paulo-Maya *et al.*, 2000). El estímulo ambiental que representa el incremento de la temperatura del agua y de la cantidad e intensidad de luz natural, desempeña un importante papel en el inicio de la actividad reproductiva en los peces (Patiño, 1997). Registros recientes sobre las condiciones de cautiverio para la temporada de desove, indicaron que esta especie se reprodujo preferentemente cuando las condiciones de temperatura del agua se encontraron entre los 18 a los 21°C y los fotoperiodos fueron de entre las 11 a 13 horas Luz (HL) (Blancas, 2002; y Blancas *et al.*, 2003, 2003a y 2004); lo que coincide con las condiciones registradas en vida silvestre. Lo anterior, concuerda con las observaciones de Figueroa y colaboradores (2003), quienes mencionaron que, esta especie en cautiverio presentó un buen porcentaje de fecundidad cuando las temperaturas del agua fueron superiores a los 17°C, y cuando ésta se ubica por debajo de esta temperatura, la fecundidad y sobrevivencia de los alevines disminuyó significativamente.

Estudios recientes sobre alimentación, fertilizaciones *in vitro* y desarrollo embrionario con la especie de pez blanco *C. humboldtianum*, indicaron que la

Antecedentes

reproducción en condiciones de laboratorio es factible. Figueroa *et al.*, (1999), ampliaron la información y mencionan que la incubación de huevos a 20°C, permitió observar el desarrollo embrionario, identificándose 20 fases embrionarias, con una duración de 216 horas. Estas investigaciones también arrojaron la información que a 22°C y 2.55 g/L de salinidad, el periodo de incubación transcurrió en 120 horas y la eclosión pudo llevarse a cabo con 0 y 1.55 g/L de salinidad sin que esto representara efectos negativos.

Lo anterior enmarca un escenario, donde se pone de manifiesto que si bien, hasta el momento se ha logrado la reproducción en cautiverio y la obtención de larvas de estos peces; lo que representa un avance substancial para la conservación de estas especies, aún se desconocen las bases del proceso anatómico-funcional de la reproducción en estas especies.

Desarrollo ovárico del pez blanco *C. humboldtianum*.

Existen pocos antecedentes directos, donde se aborde el desarrollo sexual en las hembras de la especie *C. humboldtianum* (Palacios-Saucedo, 1998; Gonzáles-Barajas, 2002; Cárdenas, 2003; Moncayo *et. al.*, 2003). La mayoría de la información existente, ha sido obtenida con base a trabajos de biología pesquera en poblaciones silvestres; estas investigaciones, ofrecen la ventaja gracias sus altas capturas, de fundamentar sus conclusiones en una buena cantidad de observaciones; pero de igual forma, presentan desventajas, como es el desconocimiento de parámetros poblacionales como son la edad de las hembras y sobre todo del historial reproductivo de los organismos capturados.

Algunos avances en la investigación de la reproducción fueron dados a conocer en la Primera Reunión Nacional de Atherinópsidos (noviembre del 2003 en México Distrito Federal). En este foro, Moncayo *et al.* (2003) presentaron una caracterización para las gónadas de las hembras del pez blanco de la especie *C. humboldtianum*, los cuales fueron capturados en la presa Huapango del Estado de México. Estos peces, según lo descrito, tienen ovarios de aspecto sacular unidos por el extremo distal y están cubiertos de una túnica albugínea. Presentan sacos ovígeros y dentro de ellos, un epitelio germinal formado por las ovogonias y los folículos con diferente grado de desarrollo. Según la descripción, los ovocitos de los folículos de la previtelogénesis tienen primero citoplasma

Antecedentes

basófilo, después es acidófilo y finalmente se vacuoliza; en esta misma etapa se desarrollan las células foliculares y el corión. No evidencian la formación de las células de la teca. En esta investigación clasifican a los estadios del desarrollo de los folículos con letras, las cuales van desde el A hasta el G. En ella, mencionan que las células de la granulosa se observan como inclusiones entre el ovocito y los folículos y a éste estadio se le identificó con la letra D, no observan en sus preparaciones histológicas folículos con ovocitos atrésicos. Finalmente, concluyeron en ese momento, que las hembras mostraron un desarrollo ovárico asincrónico característico en hembras que presentan temporadas largas de reproducción (lo cual se considera en éste trabajo, como una clasificación no adecuada). Otros autores, quienes trabajaron con esta misma especie (González, 2002; Cárdenas, 2003), describieron el mismo patrón en la ovogénesis basada principalmente en la clasificación reportada para la mayoría de peces Teleósteos descrita por Wallace y Selman en 1990.

En la mayoría de los estudios donde se describe el desarrollo gonádico para estos peces, se emplearon Escalas Empíricas de Desarrollo Gonádico diseñadas principalmente para especies marinas. El antecedente directo, donde se empleó una Escala Internacional de Maduración para el género *Chirostoma* es el trabajo de Solórzano (1961), posteriormente, Peralta (1991) contribuyó la descripción con observaciones histológicas en el pez blanco de la especie *C. estor copandaro*. Lo que determina la necesidad de contar con una Escala de Maduración específica para las distintas especies de peces blancos, aplicada a los demás peces del género.

En trabajos histológicos del género (González-Barajas, 2002; Moncayo *et al.*, 2003; Figueroa, 2006; Ramírez, 2006), se incluye, como carácter distintivo, la aparición de estructuras proteicas en la periferia del ovocito, las se conocen como estructuras adherentes. Otro aspecto importante, es que se emplea indistintamente el término folículo y ovocito, lo que ha sido motivo de controversia; lo anterior sucede al momento de definir los estados de desarrollo en la ovogénesis anteponiendo la palabra ovocito a los siguientes términos: en estadio de decromatina nuclear, en estadio perinuclear, en estadio de alveólo cortical, en estadio vitelino temprano, intermedio y tardío, en maduración y finalmente en estadio de ovulación. Evans (1995) refiere al folículo ovárico como "la unidad anatómica funcional del ovario", en tal caso, y a juicio del autor de esta

Antecedentes

tesis- deben ser descritos los estadios de la ovogénesis, como: folículos cuyos ovocitos se encuentran en cada una de las fases mencionadas anteriormente, criterio adoptado en el presente trabajo.

Niveles hormonales en peces.

La participación de las hormonas esteroides sexuales en el proceso reproductivo en peces, se ha puesto de manifiesto en numerosas investigaciones. Las hormonas esteroides masculinas están representadas por los andrógenos, principalmente la testosterona (T), mientras que los esteroides femeninos, los constituyen los estrógenos, dentro de los que destacan: la estrona (E_1), el 17β -estradiol (E_2) y el estriol (E_3). Es importante destacar, la participación de la Progesterona (P_4), que constituye el precursor de las demás hormonas esteroides sexuales (Evans, 1995).

Para los peces teleósteos, la información de los perfiles hormonales característicos indican que, en las hembras, es primordial la participación, de los estrógenos en los primeros procesos de la ovogénesis y que algunas progestinas acompañan el periodo de madurez del folículo, la ovulación y el desove; mientras que en machos, la testosterona presenta pocos cambios cuando se lleva a cabo la espermatogénesis (Muñoz, 2003)

El análisis de los perfiles hormonales, muestran para las hembras la marcada participación del E_2 en las primeras etapas de la ovogénesis y destacándose también la participación de la progesterona y particularmente algunos de sus metabolitos como la $17\alpha,20-P_4$ y en muchas especies la $17\alpha,20,21\alpha-P_4$, las cuales acompañan a las últimas etapas de la ovogénesis muy cercanas a la ovulación (Young *et al.*, 1982; Kagama *et al.*, 1984; Smith y Thomas, 1990; Swanson, 1991; Yoshikuni y Nagahama, 1991; Redding y Patiño, 1993; Thomas, 1994; Kobayashi *et al.*, 1996; Patiño, 1997; Mylonas y Zohar, 2001; Devlin y Nagahama, 2002).

En la tabla 2 se muestran algunos antecedentes con distintas especies de peces Teleósteos. Dichos valores fueron reportados para las fases del desarrollo sexual en hembras, en condiciones naturales, de cautiverio y bajo estimulación ambiental.

Tabla 2. Concentraciones de 17 β -estradiol y 17 α ,20 β dihidroxiprogesterona, circulante en algunos peces Teleósteos.

Especie	17 β -estradiol (17 β E ₂)	17 α ,20 β dihidroxiprogesterona (17 α ,20 β -P ₄)	Fuentes
<i>Acheilagnathus rhombea</i>	3 - 13 ng mL ⁻¹	1 - 8 ng mL ⁻¹	Aida, 1988.
<i>Cyprinus carpio</i>	0.2 - 1.2 ng mL ⁻¹	0.2 - 90 ng mL ⁻¹	
<i>Oreochromis niloticus</i>	3.5 - 8.4 ng mL ⁻¹ 14 - 17 ng mL ⁻¹	nd	Little <i>et. al.</i> , 2000
<i>Latris lineata</i>	0 - 6 ng mL ⁻¹	nd	Morehead <i>et. al.</i> , 2000
<i>Acanthopagrus butcheri</i>	0.5 - 1.5 ng mL ⁻¹	20 - 50 ng mL ⁻¹	Haddy y Pankhurst, 2000
<i>Morone sp.</i>	2 - 6-ng mL ⁻¹	1 - 3 ng mL ⁻¹	Mylonas y Zohar, 2001
<i>Lateolabax maculatus</i>	0.38 - 0.39 ng mL ⁻¹	0.03-0.048 ng mL ⁻¹	Lee y Yang, 2001.
<i>Petenia splendida</i>	0.2 - 2 ng mL ⁻¹	nd	Pérez, 2006.
<i>Cichlasoma managuense</i>	0.1 - 2 ng mL ⁻¹		
<i>Acipenser transmontanus</i>	1 - 4 ng mL ⁻¹	50 - 120 ng mL ⁻¹	Webb <i>et al.</i> , 2001.

Nd = no determinado

De igual forma destaca la testosterona plasmática a lo largo de todo el proceso de la espermatogénesis en machos. Dentro del perfil hormonal, se hace patente el papel que poseen la gonadotropinas (GtH), como "disparador" de la ovulación y la subsecuente participación de los estrógenos (Forniés *et al.*, 2001).

Otra de las investigaciones, donde se describe los cambios plasmáticos en la maduración sexual, es la realizada en machos de la especie *Dicentrarchus labrax*, por Rodríguez *et al.* (2001), en ella concluyen que los altos niveles de testosterona circulantes predominan en casi todo el desarrollo gonádico. En ésta, los valores altos del índice gonadosomático (IG), coinciden con descensos de éste andrógeno y esto ocurrió cuando se acerca la fase final de la reproducción. Estos últimos investigadores, reportan además, el comportamiento del perfil hormonal con estimulación de fotoperiodo.

Por todo lo anterior, se visualiza una interesante controversia, de la participación de las hormonas esteroides sexuales circulantes en peces y sobre todo sus niveles

Antecedentes

reportados, la investigación en especies de importancia como el pez blanco, ofrecerá una contribución significativa en este tema.

Estimulación ambiental para la reproducción.

Estos y otros estudios, fundamentan la respuesta fisiológica de los peces a los cambios ambientales de temperatura y fotoperíodo principalmente, su función reguladora en la reproducción, y el uso de herramientas novedosas como los de ciclos fototérmicos artificialmente comprimidos para inducir la reproducción controlada en especies importantes como el Pez Blanco (Blancas, 2002, Blancas *et al.*, 2003 y 2004). Al respecto, se menciona que para este pez, una estimulación ambiental basada en ciclos estacionales artificialmente comprimidos, acelera el desarrollo gonádico y la espermatogénesis en reproductores, inclusive la estimulación resulta tan eficiente, que los machos presentan emisiones de semen "reflejas" sin la necesidad del cortejo con la hembra. A diferencia de estos, las hembras requieren de una preparación mayor para desovar. Una observación importante, es que las hembras estimuladas ambientalmente probablemente detienen su proceso de maduración al ser estimuladas negativamente con condiciones invernales y reanudan con su proceso de maduración y desoves al encontrar nuevamente estímulos ambientales de mayor temperatura del agua y horas luz.

Estos antecedentes, no tienen un respaldo endocrinológico, al carecer de información escrita de los niveles hormonales sexuales que acompañaron el desarrollo sexual mostrado en esta especie bajo estimulación ambiental, de igual forma, se desconoce, cuales son los cambios histológicos gonadales asociados. El panorama anterior, demanda un estudio anatómico funcional del proceso reproductivo, y de esta forma lograr obtener información importante que contribuya al lograr la reproducción controlada de peces como el pez blanco.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Los cambios en las condiciones de los cuerpos de agua lacustre de nuestro país, caracterizados por la reducción en el volumen, el impacto ambiental que sufren por la actividad antropocéntrica y la sobreexplotación del recurso acuífero; han provocado la pérdida de hábitats naturales de algunas especies nativas. Aunado a lo anterior, la introducción de especies exóticas, ha contribuido a que la fauna endémica se encuentre bajo una constante presión ambiental y en muchas ocasiones, esto propicia su desplazamiento ecológico; es el caso de los Aterinópsidos, particularmente de las especies del género *Chirostoma*. Aunado a lo anterior, las dificultades que ofrecen estos peces al manejo, y la reproducción controlada en cautiverio, sobre todo en las hembras (Blancas *et al.*, 2004), plantean un escenario en el cuál es difícil dominar por completo el proceso de su cultivo.

Actualmente, persisten lagunas en la información concernientes al proceso reproductivo en todas las especies de pez blanco. Por ejemplo, la información que existe acerca del desarrollo gonádico a nivel de tejido no es contundente; además, no se cuenta con la información de los mecanismos endocrinos de la reproducción de estas especies; también se tiene la Incertidumbre de la edad de primera reproducción en las hembras; de igual manera, se desconoce cómo se lleva a cabo el inicio de la maduración reproductiva y de que manera está relacionado con los niveles séricos de las hormonas sexuales. Resulta por lo tanto, imprescindible una investigación integral, que contemple los aspectos reproductivos anatómico-funcionales donde se conozca además, la edad exacta, de una población que inicia con su primera actividad reproductiva.

Los peces blancos, por ofrecer un alto potencial comercial dentro de las pesquerías nacionales y de la acuacultura, y además, por representar un importante legado histórico para los mexicanos y haber caracterizado tradicionalmente nuestra pesquería artesanal; justifican todos los esfuerzos en las investigaciones que conlleven a conservar y aprovechar racionalmente este recurso biológico.

HIPOTESIS

Si el pez blanco, presenta uno o varios eventos reproductivos debido a su desarrollo sincrónico por grupos y el grado de desarrollo ovárico depende del estado de madurez ovárica, entonces, los valores del IG y del IH variarán conforme al estadio predominante de los folículos en el ovario, lo que tendrá una correspondencia directa con el estado de madurez ovárica.

Si el desarrollo gonádico del ovario en el pez blanco, está caracterizado por los niveles circulantes de hormonas esteroideas sexuales, entonces, la participación del 17β -estradiol será significativa en las fases vitelinas del desarrollo gonádico y la 17α -hidroxiprogesterona por ser precursor de la HIM, acompañará los eventos finales de la ovogénesis.

OBJETIVO GENERAL

Describir el ciclo reproductivo en hembras de primera reproducción del pez blanco *Chirostoma humboldtianum*, mediante el análisis morfo-funcional de los procesos de la madurez gonádica, la micro estructura del ovario y el grado de desarrollo en la ovogénesis, asociado con los niveles circulantes de las hormonas esteroides sexuales 17β -estradiol (E_2) y 17α -hidroxiprogesterona ($17-P_4$), en las épocas de desove y de descanso reproductivo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Conocer la edad de primera maduración sexual en hembras de pez blanco, la intensidad y la duración del periodo reproductivo en cautiverio.
- 2.- Evaluar estadio de madurez ovárica (EMO), con base en los Índices gonadosomático, hepatosomático, porciento de cavidad visceral (PCV) y el peso corporal de la hembra y su posible relación, tanto en el periodo reproductivo como en el de descanso sexual.
- 3.- Diseñar una Escala Empírica de Madurez Ovárica para peces blancos, conforme a criterios morfológicos de la gónada, el PCV, la edad de la hembra, el valor del Índice gonadosomático y la actividad reproductiva.
4. Caracterizar macroscópicamente la estructura del ovario y describir el proceso de la ovogénesis, y la composición folicular, mediante su análisis histológico.
- 5.- Evaluar la concentración de las hormonas esteroides 17β -estradiol, y 17α -hidroxiprogesterona, asociadas a su actividad sexual y al desarrollo ovárico.

MATERIALES Y METODOS

Los reproductores de *C. humboldtianum* fueron capturados de una población silvestre presente en la Presa "Las Tazas" municipio de Jocotitlán, Estado de México en el año 2001. Fueron transportados y acondicionados a estanques circulares de 3,500 litros, en la Planta Experimental de Producción Acuícola (PExPA), de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, logrando su reproducción en 2002 y así, obteniendo así la primera generación en cautiverio (F1), (Blancas *et al.*, 2003 y 2004) ésta generación sirvió de base para este estudio y estuvo constituida por 226 reproductores de ambos sexos. La determinación taxonómica de la especie fue realizada inicialmente con ayuda de las claves supra-genéricas descritas por Dyer y Chernoff (1996) y White (1985), y para las categorías infra-genéricas empleando la clasificación de Barbour (1973b). Se confirma posteriormente, con el trabajo de Paulo-Maya (2004) y de forma contundente, se ubica a este pez blanco como *Chirostoma humboldtianum*, por el trabajo de Barriga-Sosa *et al.* (2005), donde los autores respaldan sus conclusiones con el empleo de técnicas moleculares en la identificación de ésta especie.

La investigación, inició cuando la generación F1 empezó con su primera actividad reproductiva (2003). Un total de 50 hembras fueron sacrificadas sistemáticamente tanto en la época de desoves, como durante la época de recuperación sexual, con el objetivo de monitorear el desarrollo ovárico durante un ciclo completo. Una vez sacrificadas, se les determinó de acuerdo a su Estadio de Madurez Ovárica (EMO). Además, se disectaron los organismos obteniendo el IG y IH respectivo. Paralelamente fueron obtenidas las muestras sanguíneas correspondientes.

Los tejidos gonadales fueron preparados para su análisis histológico y la subsiguiente digitalización de las imágenes (evaluación de los ovocitos conforme a estado de desarrollo, su diámetro y frecuencia con la que aparecen en cada ovario). Colateralmente, fueron procesadas las respectivas muestras de suero sanguíneo para cuantificar los niveles séricos de las hormonas esteroides sexuales del 17 β -Estradiol (E₂), de la 17 α -hidróxiprogesterona (17-P₄). Finalmente, se analizó la relación entre el desarrollo ovárico con los niveles circulantes de hormonas sexuales encontrados desde un punto de vista anatómico-funcional.

Identificación de la primera edad y talla reproductiva.

La población F1 de peces blancos en estudio, como ya se mencionó fue de 226 organismos de ambos sexos y edad conocida. Estos peces, desde su nacimiento estuvieron agrupados en tres cohortes de acuerdo a su edad. La primera cohorte la constituyeron 158 organismos; la cohorte 2 agrupó 42 peces y finalmente la cohorte tres la formaron 26 peces. Se contó con un registro estricto de su crecimiento por medio del monitoreo de sus datos biométricos de estos organismos, además del registro del momento cuando inician los desoves, estos datos fueron dados a conocer por Blancas, (2002). La investigación se inició en el mes de enero del 2003, y para ese momento los organismos de la cohorte 1 tenían 10 meses de edad, los de la cohorte 2 contaban con 11 meses y la cohorte 3 de 12 meses de edad.

Los estanques experimentales fueron acondicionados con las siguientes características: una capacidad máxima de 3,500 litros de agua, la cual se ajustó a una salinidad de 2.5 g/L, con sal de salina, libre de yodo. El agua fue sometida a aireación constante para lograr los valores de oxígeno disuelto recomendados para estos organismos cuyo intervalo fue de los 4.8 y 6.9 mg/L. No se manipuló la temperatura del agua, ni el ciclo de luz-oscuridad, las variaciones se debieron a las condiciones ambientales naturales de la Ciudad de México durante todo el año, las cuales también fueron registradas. La calidad del agua caracterizada por la Temperatura, Oxígeno disuelto, pH, y Nitrógeno amoniacal total, fue evaluada semanalmente. La alimentación consistió en alimento vivo, basado en cinco grupos tróficos (Cladóceros, larvas de Poecílidos, Artemias, Larvas de Dípteros y gusanos de fango), se suministró el alimento a saciedad, fomentando siempre sus hábitos alimentarios propios de un depredador. Estas condiciones resultaron idóneas para el cultivo y la reproducción del pez blanco, según lo recomendado por varios autores (Sasso *et al.*, 1997; Figueroa *et al.*, 1999; Blancas, 2002; Blancas *et al.*, 2003; Mares y Morales, 2003; Blancas *et al.*, 2004; Figueroa *et al.*, 2004, Ramírez, 2006).

El trabajo experimental, comenzó con el registro de los datos biométricos de los organismos de cada cohorte: longitud total (lt) en milímetros con ayuda de un ictiómetro y peso total (pt) en gramos, con una balanza digital marca OHAUS (modelo GT 4800, NY),

Material y Métodos

con una precisión de 0.1 g. Para realizar las biometrías, los peces fueron anestesiados previamente con Benzocaína al 1.6% en base a alcohol, con una dosis de 1ml/L durante tres minutos en promedio. Paralelamente al registro de estos datos, se determinó el sexo, y se observó el grado de avance en su madurez gonadal.

Se realizó el registro de la primera edad reproductiva en cada lote, anotando: 1) fecha de cada evento por cohorte; 2) porcentaje total de huevo fecundado y 3) periodo de duración de la época reproductiva en cada grupo.

Indicadores de Madurez gonádica: (morfometría de los peces, evaluación de la madurez gonádica, índices gonadosomático (IG) y hepatosomático (IH)).

Conforme a la secuencia de la investigación, se fijó un tamaño de muestra de 50 hembras (con base al número de hembras disponibles y a la capacidad de análisis tanto histológico como endocrinológico). El diseño implicó el sacrificio sistemático incluyendo peces de las tres cohortes (por lo regular cada 3 semanas), hasta reunir 30 hembras en la temporada reproductiva y 20 más durante la época de recuperación, asegurando con lo anterior, que en las muestras estuvieran representadas los diferentes estados de maduración ovárica (EMO).

El procedimiento inició con la anestesia de las hembras con benzocaína diluida en alcohol etílico al 1.6%, y con el registro de los datos biométricos; peso total (Pt) en gramos y longitud total (Lt) en milímetros, tanto en la época reproductiva como durante la fase de recuperación. Posterior a la evaluación biométrica, cada organismo fue disectado, haciéndole un corte longitudinal en la parte ventral desde el istmo hasta el poro anal (se tuvo cuidado de no afectar alguna vena o arteria principal para no perder muestra sanguínea). Lo anterior, permitió descubrir el corazón, para facilitar la extracción de muestra sanguínea por punción y posteriormente obtener las gónadas completas.

Se extrajeron los ovarios, se registraron sus pesos (Pg), acción que se repitió con el hígado (Ph), con ayuda de una balanza analítica OHAUS (modelo AP 110S, NJ) de 0.0001 g de precisión. Se extrajeron las vísceras y posteriormente, se registró el peso eviscerado del organismo (Pv). De igual forma, se registró la longitud de los ovarios (Lg),

Material y Métodos

la longitud de la cavidad visceral, con ayuda de un vernier de 1 mm de precisión y con ello fue posible calcular el Porcentaje de Espacio Visceral (PEV) ocupado por los ovarios, según lo recomendado por Rodríguez (1992). Finalmente, se obtuvieron las imágenes con cámara digital, para analizar su estado de desarrollo que presentaba cada ovario.

Las gónadas fueron separadas y conservadas, un ovario se mantuvo en congelación (-20° C) (para mantener sus propiedades y poder ser empleado con técnicas de inmunohistoquímica en futuros experimentos) y el otro en fijador Bouin modificado (Estrada *et al.*, 1982; Uria *et al.*, 1998), para su posterior análisis histológico. El hígado se seccionó en dos porciones y al igual que los ovarios una parte fue congelada y la otra fijada con Bouin; las muestras que fueron congeladas, serán utilizadas posteriormente para otras investigaciones.

Para el cálculo del Índice Gonadosomático (IG), se utilizaron los criterios establecidos por Rossemblum y colaboradores (1987) y Tyler y Sumpter (1996) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$IG = Pg/Pt * 100$$

Donde: IG = Índice Gonadosomático.
Pg = Peso de la gónada.
Pt = Peso total del ejemplar.

$$IGR = Pg/(Pt - Pg) * 100$$

Con la variante de Yoneda *et al.* (1998) en la que se trata de minimizar una posible interferencia de los tractos digestivos llenos, por lo que se resta el peso de las vísceras del organismo (Pv).

$$IG = Pg/(Pt - Pv) * 100$$

Se conoce como Índice Hepatosomático (IH) a la relación que existe entre el peso del hígado y el peso del organismo. Esta relación es específica para las hembras ya que

Material y Métodos

este órgano segrega vitelogeninas durante la fase conocida como vitelogénesis exógena que van a ser captadas por los ovocitos en desarrollo. Posterior a la extracción de los ovarios de las hembras, se calculó el IH respectivo, utilizando la siguiente fórmula:

$$IH = Ph / Pv * 100$$

Donde: IH = Índice hepatosomático.
 Ph = Peso del hígado.
 Pv = Peso eviscerado del pez.

Los valores de IG e IH, obtenidos, fueron analizados mediante gráficos con respecto a la temporada y así poder observar su relación con la actividad reproductiva registrada y correlacionándolos con el peso de cada hembra. Se aplicó un análisis no paramétrico que consistió en un diagrama de cajas con bigotes (Salgado-Ugarte 1992), para conocer el arreglo que guardaron los valores del IG en la temporada reproductiva. Los pesos (Pt, Pg, Ph) y longitudes (Lt, Lg), de las gónadas, hígados y del organismo, fueron analizados estadísticamente con un matriz de correlación o diagrama de escalera, en base 10 y en transformados a logaritmo natural para observar su tendencia en ambas modalidades. Este tratamiento estadístico sirvió para observar la posible relación entre los datos biométricos como posibles indicadores de la maduración sexual, y posteriormente respaldarlas con la aplicación de un ANDEVA (Zar, 1999).

Diseño de la Escala Empírica de Madurez Ovárica para peces blancos.

Para cubrir dicho objetivo se amplió el tamaño de muestra a 75 hembras (las 50 hembras en estudio y posteriormente 25 más, de edad conocida), conforme a lo ya descrito, estos peces fueron sacrificadas a lo largo de la investigación. El sacrificio se realizó empleando benzocaina como anestésico, inmediatamente después de la disección, se hicieron observaciones en fresco de la apariencia de los ovarios aún dentro de la cavidad visceral. Una vez obtenidas las gónadas y registradas sus medidas morfológicas (peso y longitud), se describieron sus características *in situ* y posteriormente, se obtuvieron las imágenes respectivas con una cámara Digital Marca Canon para acompañar cada descripción.

Material y Métodos

Las características observada fueron las siguientes: 1) la apariencia general del desarrollo ovánico, lo que indicó de forma indirecta el grado de madurez sexual de las hembras; 2) el color y brillo de los ovarios, que aporta información complementaria; 3) la textura del tejido o cubierta exterior (túnica albugínea), que es peculiar para cada estadio de desarrollo; 4) su PCV que ocupan las gónadas y 5) la longitud de las mismas.

Las escalas propuestas por Solórzano en 1961 y por Rosas en 1981 fueron consideradas como base, para proponer una Escala de Madurez Ovática para el pez blanco, utilizando los valores del IG de los ovarios como base inicial de la propuesta, y apoyada por la edad de la hembra.

Estructura microscópica del ovario y descripción del proceso de la ovogénesis. Análisis histológico y composición folicular.

Para describir y analizar microscópicamente la estructura interna del ovario, se sometieron 50 ovarios (una rama del ovario por hembra) de la población en estudio a un procedimiento histológico en el laboratorio de Ecotoxicología del Departamento de Hidrobiología de la UAM-I, bajo el asesoramiento de la Dra. Xóchitl Guzmán y las sugerencias y experiencia del Dr. José Sepúlveda y de la Dra. María del Carmen Uribe Aranzábal.

Aunque existen variaciones en el método, el procedimiento en forma general consistió en los siguientes procesos: la fijación, la deshidratación, aclaración, prefunción e inclusión en parafina, corte en micrótomos, des-parafinación y finalmente la tinción y montaje en resina (Lee, 1974, Estrada *et al.*, 1982; Uña *et al.*, 1998) (Anexo 1).

Para caracterizar la micro-estructura ovática, se observaron las preparaciones al microscopio óptico Olympus CX31 (Olympus, Corporate Center Drive, Melville, NY) y se capturaron las respectivas imágenes digitales, empleando los diversos lentes de aumento del equipo (10, 20, 40 y 100X). Se empleó el programa analizador de imágenes K6 300 de Zeiss. Las imágenes, se emplearon para caracterizar la estructura histológica del ovario del pez blanco y posteriormente para identificar los diferentes Estados de Desarrollo Folicular

Material y Métodos

(EDF) que caracterizaron el proceso de la ovogénesis, tomando como base la clasificación hecha por Wallace y Selman (1990) y el antecedente directo en la especie de Moncayo *et al.*, (2003). El procedimiento anterior, se realizó para todas y cada una de las muestras preparadas y en las cuales se tienen representadas todas las hembras en estudio que abarcaron todo el ciclo reproductivo.

Con base a lo señalado anteriormente, fueron reconocidos los siguientes EDF: a) Cromatina Nuclear = Folículos Primarios (FP); b) Perinuclear = Folículos Secundarios (FS); c) Alveólo Cortical = Folículos Terciarios (FT); Estado Vitelogenético = Folículos Vitelinos (FV) y e) Estado de Maduración = Folículos Maduros (FM). Para conocer la composición folicular y su biometría (diámetro mayor) y lograr la confiabilidad estadística en estos resultados (Zar, 1999), se contaron y midieron 100 folículos de cada estado de desarrollo, con ayuda del analizador de imágenes. En virtud de que el número de folículos en cada EDF, dependió del EMO, para cubrir con el tamaño mínimo de muestra fue necesario analizar: cinco preparaciones histológicas de ovarios en el estadio de maduración ovárica I, nueve en el estadio II, 14 en el estadio III, 12 en el estadio IV, y 16 para el estadio V.

Se realizó un ANDEVA, para conocer si existe diferencia significativa, entre la composición folicular en ovarios con el mismo EMO comparando ambas temporadas.

Evaluación de la concentración de las hormonas esteroideas: 17 β -Estradiol (E₂), 17 α -hidróxi-progesterona (17-P₄).

El diseño experimental, se basó principalmente en la cantidad disponible de hembras de pez blanco de primera edad reproductiva y a la infraestructura disponible. Este contempló el análisis de 50 muestras (30 en temporada reproductiva de marzo a julio y 20 en temporada de descanso de octubre a enero del siguiente año). En la época de reproducción, se realizaron cinco tomas de muestras sanguíneas, la primera el 14 de abril y la última el 8 de julio del 2003; en cambio, en la fase de descanso reproductivo, se efectuaron en tres tomas de muestras; la primera fue el 17 de noviembre, la segunda el 2 de diciembre, para finalizar en enero del 2004. Lo anterior, se fundamentó en el tiempo la

duración de la temporada reproductiva y en la gran similitud que presentaban las hembras en su desarrollo gonádico durante la época de reposo, haciendo innecesario sacrificar igual número de organismos que en la temporada reproductiva. Con el diseño anterior, se garantizó la obtención de los distintos estados de madurez gonádica. El seguimiento de la actividad reproductiva, permitió conocer la edad exacta de cuando iniciaron y cuando concluyeron con su primera actividad reproductiva, y la relación con algunos niveles hormonales.

Las hormonas esteroides sexuales circulantes analizadas, fueron el 17β -Estradiol (E_2), 17α -hidróxiprogesterona ($17-P_4$). La primera, por ser el estrógeno que tiene un importante papel en la etapa vitelogénica, y la segunda, como precursor de la $17\alpha,20\beta$ -dihidróxi-progesterona ($17\alpha,20\beta P_4$), que se conoce como el hormona inductora de la maduración (HIM) la $17\alpha,20\beta$ -dihidróxi-4-pregnen-3-ona ($17\alpha,20P_4$) y en muchas especie la $17\alpha,20\beta,21\alpha$ -trihidróxi-4-pregnen-3-ona ($17\alpha,20,21\alpha-P_4$) y por lo tanto se encuentra circulando en la etapa de maduración y ovodepositación (Young *et al.*, 1982; Kagama *et al.*, 1984; Nagahama, 1987; Smith y Thomas, 1990; Swanson, 1991; Yoshikuni y Nagahama, 1991; Redding y Patiño, 1993; Thomas, 1994; Kobayashi *et al.*, 1996; Patiño, 1997; Nagahama, 1997; Mylonas y Zohar, 2001; Devlin y Nagahama, 2002).

Para estandarizar la técnica, se emplearon dos reproductores hembras, las cuales, fueron anestesiadas con Benzocaína (1.6%). Se utilizaron jeringas para insulina heparinizadas de dos mililitros de capacidad y agujas de calibres 21 y 23. Lo anterior, de acuerdo a los trabajos de Alaye (1993 y 1996) quién desarrollo investigaciones con componentes sanguíneos de sangre en otros Aterinópsidos del mismo género.

En todos los casos, las muestras de sangre se colocaron en tubos Eppendorff de 2,000 microlitos (μL) y posteriormente, se les dejo reposar en condiciones de refrigeración ($4^\circ C$) por 24 horas, para lograr que el suero sanguíneo se separara de los demás componentes sólidos del plasma (Alaye, 1993). Inmediatamente después, se procedió a centrifugar cada muestra en una centrifuga Beckman, modelo J2-MC, a 3,000 revoluciones por minuto (*rpm*) durante 15 minutos y a una temperatura de $4^\circ C$. El suero se extrajo y se colocó en tubos Eppendorff estériles, no sin antes, registrar el volumen con

Material y Métodos

ayuda de una pipeta electrónica automática digital, marca Rainin, con una precisión de 0.1 μL . El suero se conservó a -20°C para su posterior evaluación hormonal mediante la técnica de Radioinmunoanálisis (RIA).

Las hormonas esteroides circulantes del pez blanco, fueron evaluadas por Radioinmunoanálisis (RIA), utilizando anticuerpos de alta especificidad para cada hormona los cuales fueron obtenidos en el Laboratorio de Fisiología y Endocrinología de la Adaptación y la Reproducción del Departamento de Biología de la Reproducción, de la UAM Iztapalapa y según la descripción realizada por Herrera y colaboradores (1993).

El empleo de la técnica para la medición en esta especie, representó un reto por varias razones, entre las que se destacan: a) la composición del suero y dentro de ellos la de estos esteroides, b) la presencia de sustancias tales como proteínas, lípidos y fibrinógenos que pudieran interferir en la detección, y c) los de los pequeños volúmenes de suero sanguíneo que se obtienen en éstos organismos (Alaye, 1993). Por lo tanto, fue necesario adaptar la técnica, estandarizarla y finalmente obtener curvas de calibración, lo suficientemente sensibles para: a) detectar hasta cinco pico-gramos por mililitro, b) purificar las muestras, c) concentrarlas sin perder esteroides y finalmente, por medio de eluciones separar las hormonas y lograr un buen porcentaje de recuperación de las mismas. Los procedimientos anteriores, pueden consultarse en el Anexo 2.

El suero del pez blanco, fue descongelado y vuelto a centrifugar durante 15 minutos a $2500 \times \text{rpm}$ a 4°C , para separar componentes sólidos que podrían interferir en la medición de volúmenes exactos. En el caso de los sueros que solidificaron, se extrajeron las hormonas, al agregar volúmenes conocidos de agua caliente a 45°C y zonificarlas, y por centrifugación obtener nuevamente en solución los esteroides.

El volumen de suero necesario como resultado de la estandarización de la técnica para esta especie y con base a lo encontrado por Pérez (2006) fue de $100 \mu\text{L}$. En tal caso, fue necesario elaborar 10 muestras compuestas (*Pools*), con aquellos sueros donde no se contaba con la cantidad suficiente para reunir este volumen. Los criterios principales para formar estas muestras compuestas, fueron dos: el primero, que se trataran de muestras de suero de hembras en la misma época de actividad sexual y la segunda, que

Material y Métodos

pertenecieran a la misma Estado de Madurez Ovárico (con todo el soporte previamente concluido del trabajo histológico - véase resultados), y por lo tanto al mismo grado de madurez sexual.

Para separar y retener los compuestos y partículas sólidas se utilizaron cartuchos de celulosa Sep-Park C18 (marca Waters- Corporation), y se obtuvo un eluido purificado de compuestos que interfieren con el análisis químico a realizar. Particularmente, se sabe que el suero sanguíneo de los peces, contiene una cantidad significativa de lípidos y otros componentes. El 17β -Estradiol (E_2) y otros estrógenos naturales están unidos principalmente a globulinas de unión a esteroides sexuales (SSBG) y en menor grado a la albúmina plasmática; por su parte, en plasma, la progesterona y algunos de sus metabolitos, están unidos a albúmina y globulinas de unión a corticoesteroides (CBG o transcortina), pero no muestra una unión apacible a la globulina de unión a esteroides sexuales (SSBG) (Goodman *et al.*, 1996). En tal caso, fue necesario excluirlas mediante una cromatografía en mini-columna de fase reversa, de acuerdo al siguiente procedimiento:

1) En un tubo con capacidad de 1.5 ml (*Eppendorff*), se colocaron 100 μ L de suero, se le adicionaron 200 μ L de agua desionizada y se mezclaron por agitación.

2) Con una jeringa para insulina, se inyectaron los 300 μ L a un cartucho (SEP-PAK C18), y con ayuda de otra jeringa, se inyectó aire para cargar totalmente el cartucho con la mezcla de suero y agua. Este procedimiento, se realizó lentamente para evitar que dicha mezcla atravesara el filtro antes de efectuar los lavados.

3) El cartucho, se eluyó con 1 mL de agua des-ionizada y se recuperó en un tubo de ensayo (tubo 1). Esta fracción, contiene un porcentaje de 76% del 17β -Estradiol y 6% de 17α -hidróxiprogesterona ($17-P_4$) extraído hasta el momento.

4) Posteriormente, se obtuvo la interfase acuosa del cartucho, aplicando una presión de aire, la cual se desechó, con lo cual se evitó el tener agua en la siguiente extracción y la dificultad de evaporarla conjuntamente con el metanol.

5) El mismo cartucho, se eluyó con 2 mililitros de metanol absoluto, esta fracción se recuperó en otro tubo de ensayo (tubo 2), en este filtrado se recuperaron los porcentajes de (4%) de 17β -Estradiol (E_2) lo que dio un total de 80% y (73%) de 17α -hidróxiprogesterona ($17-P_4$) respectivamente, lo que en conjunto suman casi 80% de esta progestina.

6) El metanol del tubo 2, se evaporó a sequedad en un baño de agua a 45°C y bajo atmósfera de nitrógeno. Con una pipeta Pasteur, se lavaron las paredes del tubo con unas gotas de metanol y así concentrar el contenido en el fondo del tubo, este también se evaporó bajo las mismas condiciones.

7) El tubo 1, después de ser agitado vigorosamente en un vórtex, se transfirió al tubo 2, para posteriormente ser enjuagado con 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos (0.2 M, 17.6 g de NaCl y 2.0 g de gelatina/litro), agitado y vaciando nuevamente al tubo 2. Esta fracción final contiene el 80% de las hormonas: 17β -Estradiol (E_2) y de 17α -hidróxi-progesterona ($17-P_4$) extraídas de la muestra de suero.

8) De esta mezcla, se tomaron por duplicado 400 μL para la cuantificación de 17β -Estradiol (E_2) y la misma cantidad con su repetición, para hacer lo propio para la 17α -hidróxi-progesterona ($17-P_4$), con la técnica de RIA.

Finalmente bajo el protocolo que marca la técnica del RIA (Herrera *et al.*, 1993; Carolsfeld, *et al.*, 1996), se procedió a cuantificar los niveles de estos dos esteroides hormonales circulantes (Tabla 3).

Como se aprecia en la tabla 3, la preparación de la curva se llevó a cabo conjuntamente con la medición de las muestras problemas, las cuales se incubaron y se centrifugaron, para evaluar el porcentaje de recuperación o de unión de cada hormona. Posteriormente, se transfirió el sobrenadante, donde se encuentran las hormonas esteroides sexuales, a un vial, al que se le agregó 5 mL de líquido de centelleo a cada uno y se agitó, para finalmente cuantificar en un contador de centelleo y de ésta forma

Material y Métodos

conocer por separado la concentración de cada esteroide, y con el coeficiente de variación se calculó el porcentaje de unión en el ensayo.

Tabla 3. Formato de la curva estándar, con 11 concentraciones tanto para la 17 β -Estradiol (E₂) como para la 17 α -hidróxiprogesterona (17-P₄), cuyo intervalo fue de 2 a 512 pg /tubo, empleadas en este análisis.

Tipo de tubo	Cuentas Totales	Unión Inespecífica (C/D)	Unión específica (Cero)	Estándares de la curva	Muestra problema
Reactivo Buffer	800 μ l	600 μ l	500 μ l		100 μ l
Sol. Estandar o muestra				500 μ l	400 μ l
Anticuerpo			100 μ l	100 μ l	100 μ l
Hormona Marcada	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Incubar de 18 a 24 horas a 4°C					
Carbón Dextran (C/D)		200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l
Incubar 20 minutos a 4°C					
Centrifugar a 2,500 rpm por 15 minutos					

Los análisis de todas las muestras de suero, se analizaron separándolas conforme al estadio de madurez sexual al cual pertenecían, tanto para la época de reproducción como la de descanso reproductivo.

Los tratamientos estadísticos para conocer la conducta de los niveles hormonales entre los EMO y entre ambas épocas se basaron en el Análisis Exploratorio de Datos (AED) (Salgado-Ugarte, 1992; Zar, 1999; Statacorp, 2003) apoyado en un ANDEVA.

Finalmente se analizó la relación anatómico-funcional entre los EMO, apoyado con datos de los IG respectivos, con las observaciones macroscópicas y microscópicas del estudio histológico y con los niveles hormonales circulantes asociados en la reproducción de las hembras del pez blanco *C. humboldtianum*.

RESULTADOS

Condiciones durante el experimento.

El monitoreo de las condiciones de cultivo durante el experimento arrojó los siguientes resultados:

a) Durante el experimento no se manipuló la variable temperatura, por tal motivo, la fluctuación de la temperatura del agua del cultivo obedeció a las condiciones ambientales propias de la ciudad de México, se registro una temperaturas promedio de 20°C, con temperaturas mínimas de 13°C para el mes de enero y máxima de 22°C para el mes de mayo. Los ciclos de luz – oscuridad a las que estuvieron expuestos los organismos, también fueron las heredadas por la ubicación de la Ciudad de México; el registro fue obtenido en la consulta periódica de la página web de la CONAGUA en su Servicio Meteorológico Nacional (smn.cna.gob.mx). El intervalo de las horas luz fue de 9 a 13 HL, con registros de los días cortos para el mes de enero y días más largos para el mes de agosto.

b) Los registros de calidad del agua de cultivo de estos peces se muestran en la tabla 4, y en ellas se incluyen para fines contrastantes registrados de cinco años de los parámetros evaluados en condiciones naturales para peces del mismo género.

Tabla 4. Valores de los parámetros de calidad del agua evaluados durante la investigación.

PARÁMETRO	Intervalo óptimo (Limón y Lind, 1989)	Intervalo durante el experimento
Oxígeno disuelto mg/L	7	4.8 -6.9
pH	8.4 -8.7	8.0 -8.5
NO ₂ ⁻ mg/L	0.40	0.30
NO ₃ ⁻ mg/L	2 -4	1.0 – 1.8
Salinidad UPS	0 - 2	2.5

UPS = Unidades Porcentuales de Salinidad

Identificación de la primera edad y talla reproductiva.

El tamaño de la población en estudio consistió en 226 organismos de pez blanco de ambos sexos, nacidos entre enero y marzo del 2002, y que constituyeron la primera generación obtenida en cautiverio (F1). La población presentó tres cohortes, cuyas edades para el mes de enero del 2003 correspondían a 10, 11 y 12 meses, respectivamente.

Al momento del inicio del experimento, se realizó un censo de los organismos. Los resultados se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Datos sobre la composición de las tres cohortes al inicio de la investigación.

Parámetro	Cohorte 1 (10 meses)	Cohorte 2 (11 meses)	Cohorte 3 (12 meses)
Número de peces (n)	158	42	26
No. de hembras.	?	24	13
No. de machos	10	18	13
No. de indeterminados	148	0	0
Peso total en gramos (PT)	Promedio = 6.56 Mediana = 6.5 DE = ± 1.64	Promedio = 11.54 Mediana = 11.0 DE = ± 1.94	Promedio = 19.57 Mediana = 18.5 DE = ± 6.89
Longitud total en cm (LT)	Promedio = 9.42 Mediana = 9.3 DE = ± 1.0	Promedio = 11.68 Mediana = 11.6 DE = ± 0.52	Promedio = 13.39 Mediana = 14.0 DE = ± 2.92

PT = Peso total; LT = Longitud total; DE = Desviación estándar.

La primera cohorte, estuvo formado por organismos que aún no alcanzaban un grado perceptible de desarrollo gonádico, puesto que la mayoría de ellos (148 de 158), al ejercer una leve presión abdominal no arrojaron ningún producto sexual, razón por lo cual fueron considerados como indeterminados; solamente diez peces emitieron una pequeña cantidad de espermatozoides al realizar una ligera presión abdominal. En este caso, el radio sexual no se pudo establecer en ese momento, sin embargo, tres meses después, se comprobó que el radio sexual fue de 1:1. Este grupo, hasta ese momento no había registrado eventos reproductivos (Figura 8 y Tabla 5).

La segunda cohorte, estuvo formada por 42 peces. En este grupo, si fue posible identificar el sexo de los peces, lo cual resultó relativamente más fácil para los machos

Resultados

(18 de 42), en virtud de que arrojaron líquido seminal bajo una ligera presión abdominal, mientras que las hembras (24 de 42), no arrojaron óvulos y no mostraron abultamiento del abdomen. Como se puede observar en la Tabla 4, el ratio sexual se acercó al reportado como idóneo para la reproducción que es de 1:1 y también, al igual que en la cohorte anterior aún no se habían registrado ovodepositaciones.

La última cohorte, se caracterizó por agrupar a 26 peces. En este caso tanto los machos como las hembras, arrojaron sus productos sexuales al ejercer una leve presión sobre el vientre, alcanzando una relación 1:1. En este lote, ya se habían iniciado los eventos reproductivos.

La primera época reproductiva de esta población, incluyendo a las tres cohortes se inició el 28 de enero y concluyó el 15 de agosto del 2003, lo que representó una amplia etapa de actividad sexual de seis meses y tres semanas. El total de ovodepositaciones sumó 77 y el por ciento de eclosión estuvo siempre en un intervalo de 95 a 97%. Al respecto, se puede observar en la figura 8 y en la tabla 6, el grado de participación que tuvieron las hembras durante la época reproductiva. La época reproductiva, es iniciada por aquellas hembras que cuentan con un año de edad, mientras que las de la cohorte 2, inician su actividad también a una edad muy cercana (11 meses y 3 semanas). Se destaca que las hembras de la cohorte 1, que corresponden a las más jóvenes, registran sus primeros desoves casi dos meses después (a finales de marzo), comparadas con las de mayor edad. En tal caso, estas hembras empezaron a reproducirse a la misma edad que las de la cohorte 2 (Figura 8).

Tabla 6. Número de ovodepositaciones y edad de los peces blancos a su primera y última puesta.

	Cohorte 1	Cohorte 2	Cohorte3
Número de ovodepositaciones.	12	32	33
Edad al primer desove (meses/semanas).	11/3	11/3	12/0
Edad al término de la temporada reproductiva (meses/semanas).	17/1	17/3	18/3

Resultados

El número de desoves por cohorte, indicó una mayor participación de las hembras más grandes que son las de mayor peso y longitud (cohorte 3), en virtud de haber registrado un total de 33 ovodepositaciones, con una participación similar a las de la cohorte 2 con 32, aunque con mayor número de hembras; mientras que, las hembras más jóvenes sólo ovodepositaron en 12 ocasiones (Tabla 6).

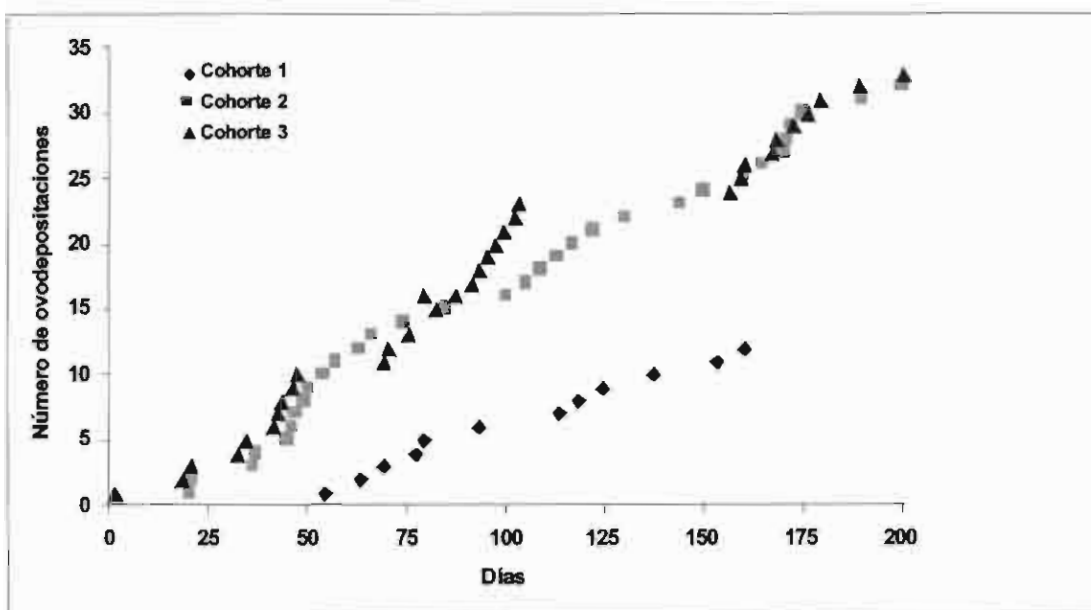


Figura 8. Ovodepositaciones de las hembras de las tres cohortes (triángulos negros = 12 meses; cuadros grises = 11 meses y rombos negros = 10 meses) durante la época reproductiva (del 29 de enero al 15 de agosto de 2003).

Finalmente, se puede observar que el lote de las hembras con mayor edad, presenta una pausa reproductiva de seis semanas, en el intervalo del 10 de mayo al 2 de julio. Por otro lado, las hembras de la cohorte dos, se comportaron con la intensidad del cohorte tres y la constancia de la cohorte uno.

Indicadores de madurez gonádica.

En la figura 9, se muestran las representaciones gráficas de las correlaciones en escaleras entre los diferentes valores morfológicos obtenidos en el presente estudio, donde se destaca la relación entre el peso de la gónada con respecto al peso total del organismo. En la tablas 7 y 8, se muestran los resultados de las matrices de correlación,

ACIA
MUSEO DE CIENCIAS DE LA NATURALEZA
ARCHIVO HISTÓRICO

Resultados

en las épocas de reproducción y reposo, donde se marcan aquellas variables que presentaron correlaciones significativas ($P \leq 0.05$).

Tabla 7. Matriz de correlación de las variables morfológicas evaluadas en la época reproductiva. Con negritas se marcan las correlaciones significativas ($P \leq 0.05$).

	lnlt	lnpt	lnpg	lnph	lnlg
lnlt	1.0000				
lnpt	0.9791	1.0000			
lnpg	0.8122	0.8459	1.0000		
lnph	0.7950	0.8727	0.7887	1.0000	
lnlg	0.7566	0.7484	0.7603	0.6313	1.0000

lnlt = logaritmo natural de la longitud total; lnpt = logaritmo natural del peso total; lnpg = logaritmo natural del peso de la gónada; lnph = logaritmo natural del peso del hígado; lnlg = logaritmo natural de la longitud de la gónada.

Tabla 8. Matriz de correlación de las variables morfológicas evaluadas en la época de descenso. Con negritas se marcan las correlaciones significativas ($P \leq 0.05$).

	lnlt	lnpt	lnpg	lnph	lnlg
lnlt	1.0000				
lnp	0.9422	1.0000			
lnpg	0.1764	0.2503	1.0000		
lnph	0.8113	0.8981	0.4683	1.0000	
lnlg	0.6677	0.7646	0.3458	0.6971	1.0000

lnlt = logaritmo natural de la longitud total; lnpt = logaritmo natural del peso total; lnpg = logaritmo natural del peso de la gónada; lnph = logaritmo natural del peso del hígado; lnlg = logaritmo natural de la longitud de la gónada.

En el presente estudio, los valores del IG calculados para cada hembra fluctuaron de 0.2 hasta 7.15, y mostraron una amplia dispersión, que caracterizó la larga época reproductiva de la especie.

El análisis exploratorio de datos de los valores del IG durante la época reproductiva, agrupó a las hembras, en cuatro bloques claramente diferenciados (Figura 10), que refleja de forma cuantitativa la diferencia de los estadios de madurez ovárica (EMO) observados en las imágenes digitales.

En la tabla 9, se presentan los criterios numéricos para la identificación de los EMO con base a los valores de IG.

Resultados

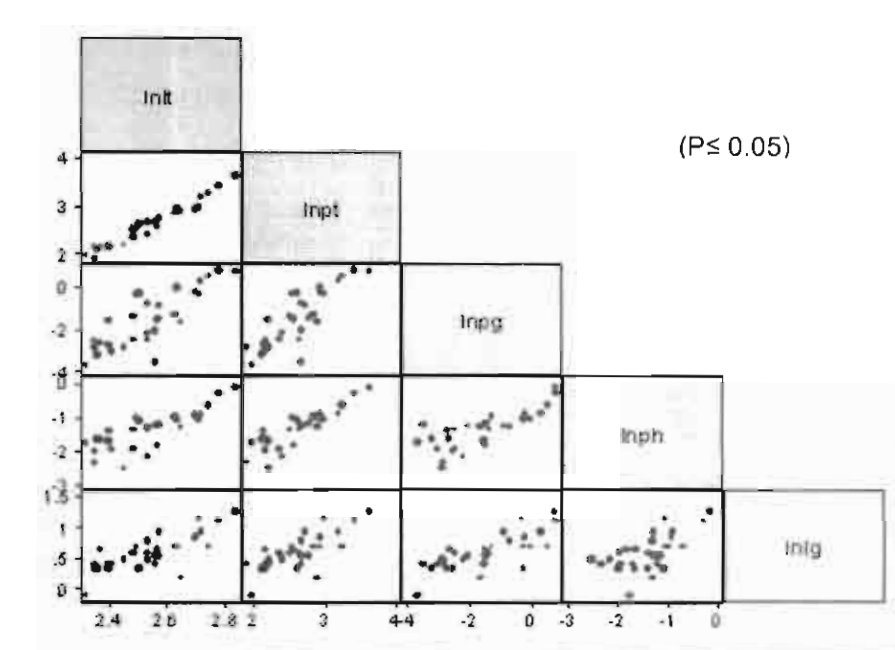
Tabla 9. Criterios numéricos de identificación en los cuatro EMO propuestos, basados en los valores de IG y el número de hembras en cada estado, para temporada de ovodepositaciones y de descanso reproductivo.

EMO	Criterio	Ovodepositaciones	Descanso
Estado I	$IG \leq 1$	13	3*
Estado II	$1 < IG \leq 3$	7	13*
Estado III	$3 < IG \leq 5$	4	4*
Estado IV	$IG > 5$	6	0
Estado V	variable	0	20**

* = Estado similar según el IG. ** = No. Acumulado.

Existe una separación estadísticamente significativamente ($P \leq 0.05$) en los valores de IG en la clasificación propuesta durante la época reproductiva (Figura 10). En la época de descanso reproductivo, todas las hembras correspondieron a hembras post-desove. Por lo tanto existen cinco Estadios de Madurez Ovárico (EMO). El último estuvo caracterizado por ovarios que presentaron valores de IG y PCV similares a algunos EMO de la época reproductiva (I al III), sin ningún patrón definido, con pocos ejemplares correspondientes al estadio III y ninguno semejante al estadio IV.

A



B

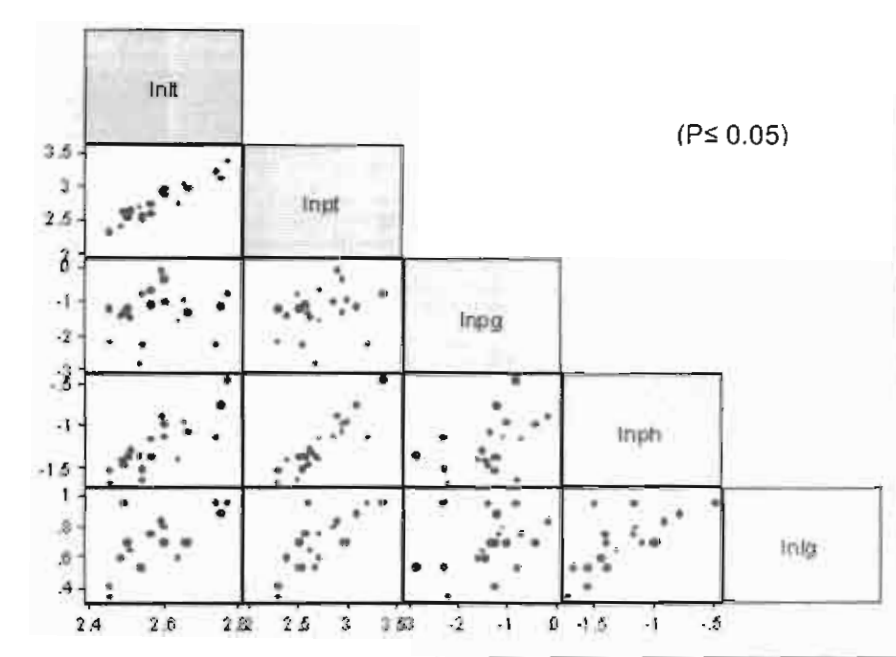


Figura 9. Correlación entre los parámetros con base al logaritmo natural: $\ln lt$ = logaritmo natural de la longitud total, $\ln pt$ = logaritmo natural del peso total, $\ln pg$ = logaritmo natural del peso de la gónada, $\ln ph$ = logaritmo natural del peso del hígado y $\ln lg$ = logaritmo natural de la longitud de la gónada; para la temporada reproductiva (A) y la de recuperación (B).



Figura 10. Diagrama de cajas donde se muestran los valores de IG por cada Estadio de Madurez Ovárica propuesto.

Resultados

En la época de descanso reproductivo, las hembras presentaron valores similares a los tres primeros estadios en la época de reproducción, por lo consiguiente, se destaca la ausencia de hembras en estadio IV (Tabla 9).

El proceso de crecimiento de los ovarios, se vio reflejado por el PCV que ocuparon en cada hembra. Los valores fluctuaron desde 5 hasta un 92% para la época reproductiva y de 7 hasta 69% en la época de descanso.

El análisis del comportamiento de los valores de IG y IH, para la temporada reproductiva se muestra en la figura 11. En ella, se destaca que los valores del IG, se incrementan de acuerdo al EMO. En contraste, los valores de IH se mantienen constantes y sólo se observa un pequeño incremento el estadio IV.

En la temporada de descanso reproductivo, el IG presenta una conducta similar sólo que en este caso el estadio IV es ausente. El IH presenta un incremento ligero en los tres primeros EMO (Figura 12).

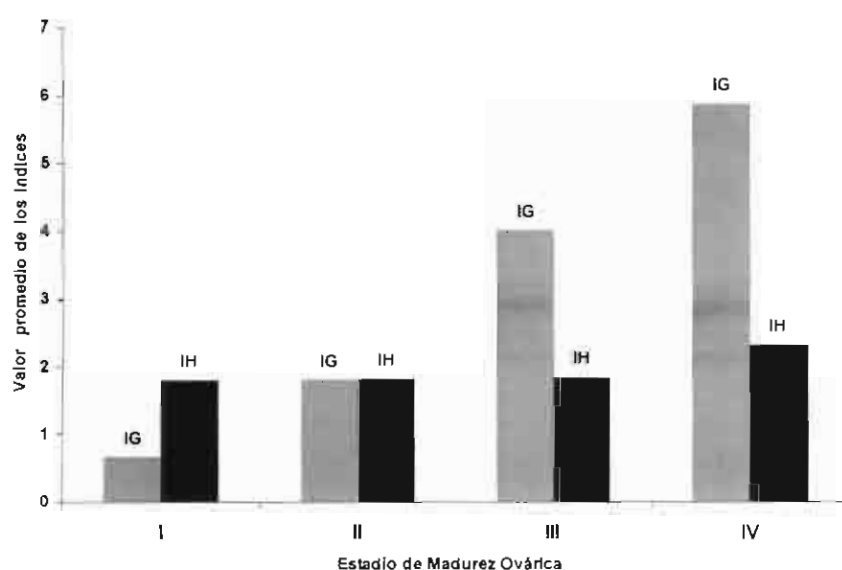


Figura 11.Valores promedio del IG y IH durante la época de reproducción conforme a su EMO.

Resultados

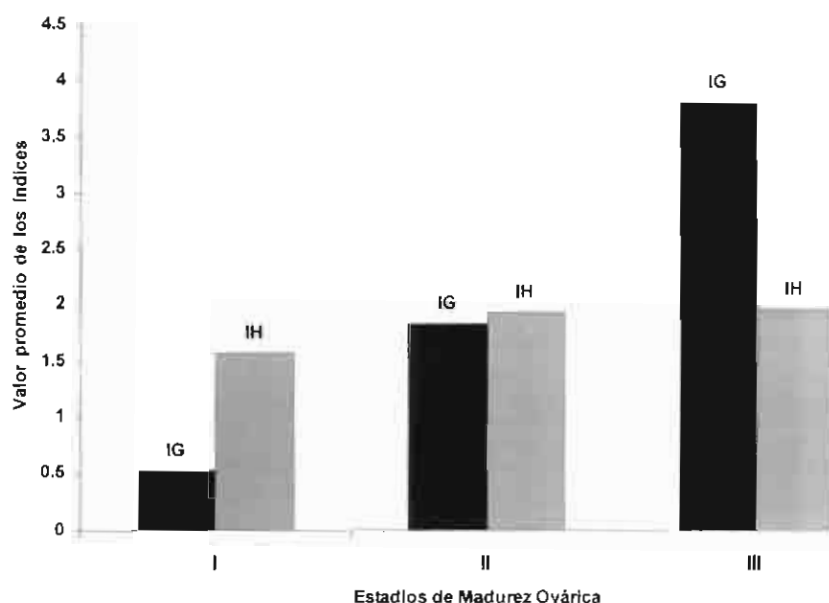


Figura 12. Valores promedio del IG y IH durante la época de descanso reproductivo conforme a su EMO.

Escala empírica de madurez ovárica para peces blancos.

Las observaciones macroscópicas de los ovarios, muestran que son de tipo bilobulado, alargados, de conformación lobular y superficie lisa con bordes redondeados. Se ubican en la región abdominal y están fijados en la parte dorsal del mesenterio. Los ovarios se encuentra en la región dorsal de la cavidad abdominal, laterales al tubo digestivo, están suspendidos de la columna vertebral y de la vejiga natatoria, donde el vértice lateral superior une al ovario con la pared del cuerpo a través del mesorquio; en tanto que, en el vértice interno, se observa la vena ovárica que corre por toda la gónada, prolongándose en su extremo anterior a través de un filamento delgado. Estructuralmente, los ovarios están delimitados por un mesorquio, que cuando inicia su madurez adquiere un color negro debido a la proliferación de melanóforos y desarrolla varias capas de musculatura lisa (túnica o cápsula albugínea) (Figura 13).

Conforme los ovocitos avanzan en su desarrollo, sus dimensiones se incrementan ocupando un mayor PCV, su túnica albugínea adquiere mayor grosor y una consistencia rugosa y brillante. Las hembras post-desove, presentan una apariencia peculiar

Resultados

de las células de la granulosa. Con la técnica utilizada en este estudio, no fue posible observar la delgada membrana basal que separa a las células foliculares. Entre la superficie del ovocito y la capa de las células de la granulosa, hay una capa acelular denominada zona radiada (ZR) o córion, que es afín a la tinción con eosina y por tanto toma un color rosa.

Una observación importante, es que a partir de los folículos vitelinos, se inicia la formación de estructuras adherentes denominados filamentos (F), que se observan como una capa de envoltura, con vesículas o estructuras circulares en forma de rosario que cubren la cubierta folicular (Figura 20).

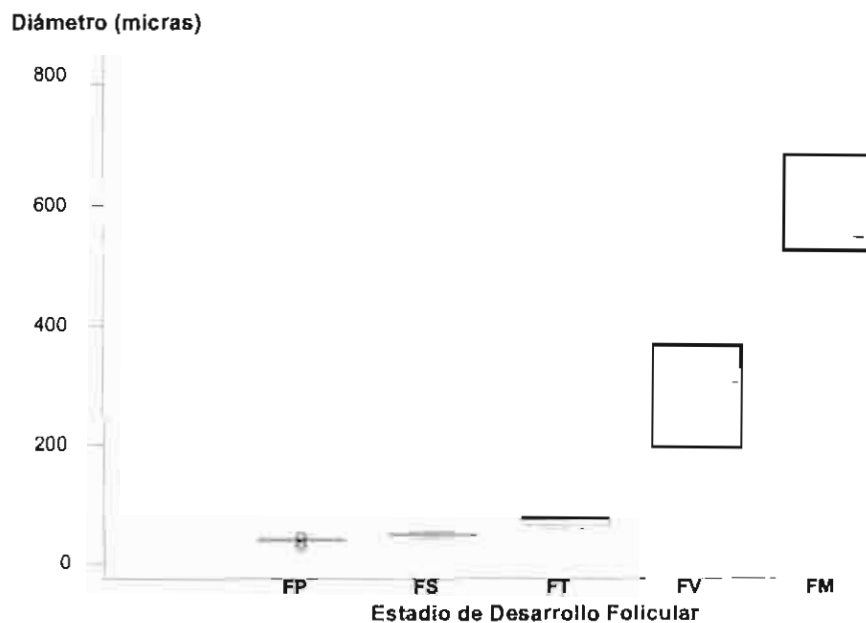


Figura 22. Diagrama de cajas donde se muestra la distribución de los datos del promedio del diámetro mayor medido en los folículos, por cada estadio de desarrollo.

La figura 22, muestra un diagrama de cajas y bigotes donde se representa el crecimiento folicular en el pez blanco. En la Tabla 11, se describe el diámetro promedio de los folículos para cada estadio de desarrollo.

Resultados

Tabla 11. Biometría de los folículos en *C. humboldtianum*. Datos promedio y desviación estándar.

EDF	Diámetro mayor en micras	Tamaño de muestra (n)
Ovogonias (* peces Teleósteos)	menor a 2 μ *	*
Folículos Primarios	29.07 $\pm$ 5.7	100
Folículos Secundarios	46.76 $\pm$ 4.12	100
Folículos Terciarios	75.4 $\pm$ 12.43	100
Folículos Vitelinos	288.68 $\pm$ 111.1	100
Folículos Maduros	598.44 $\pm$ 121.5	100
Óvulos	1 000 $\pm$ 20.0	75

(*Tyler y Sumpter, 1996)

A continuación, se describe la ovogénesis del pez blanco, de acuerdo a los criterios de Wallace y Shelman (1990) y Tyler y Sumpter (1996).

Ovogonia. Estas células solo pueden verse con claridad con microscopía electrónica y no son observables en la microscopía óptica de luz. Según los antecedentes, son células con núcleos grandes, nucleolo visible y citoplasma escaso, basófilos y de diámetro promedio menor a 2 μ , que se encuentran en la base del epitelio germinal, el cual reviste la parte interna del ovario y las bolsas ovígeras.

Folículos primarios (FP). Estado equiparable al de la Cromatina nuclear. Dentro de los folículos, los ovocitos presentan una delgada capa de citoplasma que es de naturaleza basófila. Estos folículos, son ligeramente más grandes que las ovogonias con un diámetro promedio de 29.07 $\pm$ 5.7 μ (n = 100). Presentan núcleos grandes, cuando se tiñen con hematoxilina-eosina, adquieren un color azul morado, característico de esta tinción. Las estructuras del córion y las células foliculares no son visibles bajo la microscopía de luz (Figura 23 A).

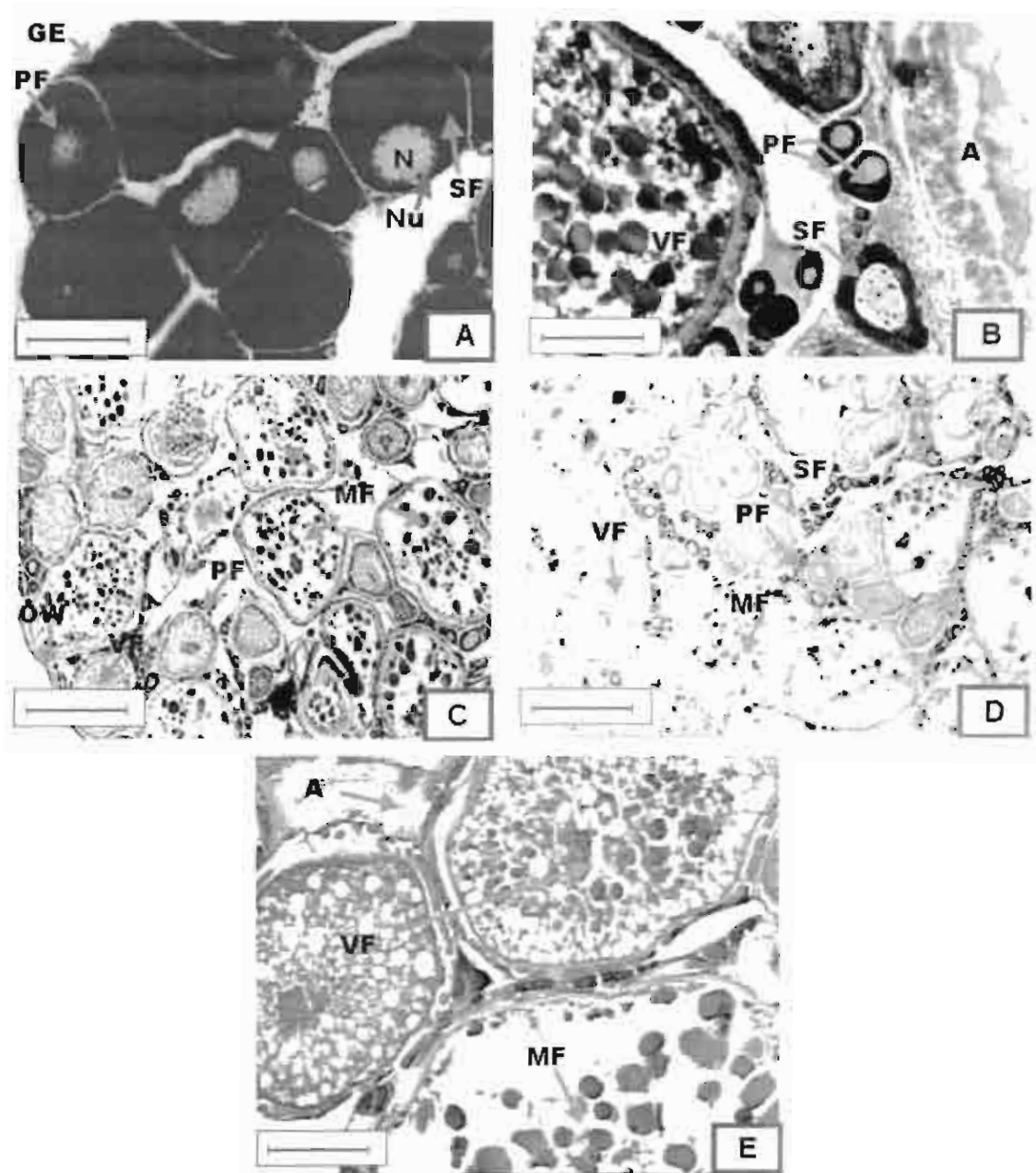


Figura 23. Estados de maduración ovárica observados en *C. humboldtianum* (H-E). A) Estado I, Inmaduro (500X), Barra = 38μ : GE = Epitelio germinal, FP = Folículo primario; N = Núcleo; Nu = Nucleolos; FS = Folículo secundario; B) Estado II, maduración temprana (200X), Barra = 89μ : A = Atresia, VF = Folículos vitelinos; C) Estado III, crecimiento ovárico (32X), Barra = 600μ : OW = Pared del ovario, FM = Folículos Maduros; D) Estado IV, en desove (32X), Barra = 600μ y E) Estado V post-desove (200X), Barra = 89μ .

Resultados

Folículos secundarios (FS). Son folículos que también se pueden clasificar como en fase perinuclear. En la figura 23 B, se aprecia en el ovocito la migración de sus numerosos nucleolos hacia la periferia del nucleoplasma. Se observó el desarrollo de pared folicular, caracterizada por tonalidades oscuras en la periferia del corión, el cual se crece y algunas vacuolas se hacen presentes en el plasma. Se presentan pequeñas inclusiones de naturaleza acidófila, las cuales posteriormente formarán parte del córion (Figura 23 B). Esta fase, se caracterizó por un marcado crecimiento comparado con los ovocitos primarios, el tamaño promedio del diámetro fue de $46.76 \pm 4.12 \mu$ ($n = 100$).

Folículos terciario (FT). Se pudo distinguir la aparición de un alveolo en el citoplasma. Esta estructura da el nombre a este estado de desarrollo conocido como estado de alveolo cortical. Se observan gotas de aceite que rodean a la vesícula germinal. Se definen mejor las capas foliculares es decir las células de la teca y las células foliculares planas, que son observables a mayores aumentos. Las sustancias glicoprotéicas se acumularon en el citoplasma de forma centripeta, dando como consecuencia el aumento de tamaño, éstas se observaron como vesículas pequeñas, distribuidas homogéneamente en el citoplasma el cual se tornó acidófilo. Continúa el desarrollo del corion. El promedio del diámetro fue de $75.4 \pm 12.43 \mu$ ($n = 100$).

Folículos vitelogénicos (FV). Este estado, es el más evidente del proceso de la ovogénesis, en virtud de que el folículo presentó cambios morfológicos significativos, como son: a) la acumulación centrífuga de vitelo, que corresponde a moléculas fosfolipoprotéicas sintetizadas por el hígado y que llegan vía la circulación sanguínea, b) los glóbulos de vitelo, obligaron a las vesículas glicoprotéicas migrar hacia la periferia del citoplasma y en la preparación se observaron de color blanco, y posteriormente se fusionaron, c) otro cambio importante, fue la formación completa de las paredes foliculares y d) se formaron las estructuras adherentes en la envoltura exterior del córion en forma de círculos y tiñeron de color rojo con la hematoxilina-eosina. El citoplasma se torna acidófilo y finalmente se vacuoliza. Fue posible observar tres sub-estados considerados como tempranos, intermedios y tardíos (Figura 23 D y E y 24). Los diámetros promedios fueron de $288.68 \pm 111.1 \mu$ ($n = 100$).

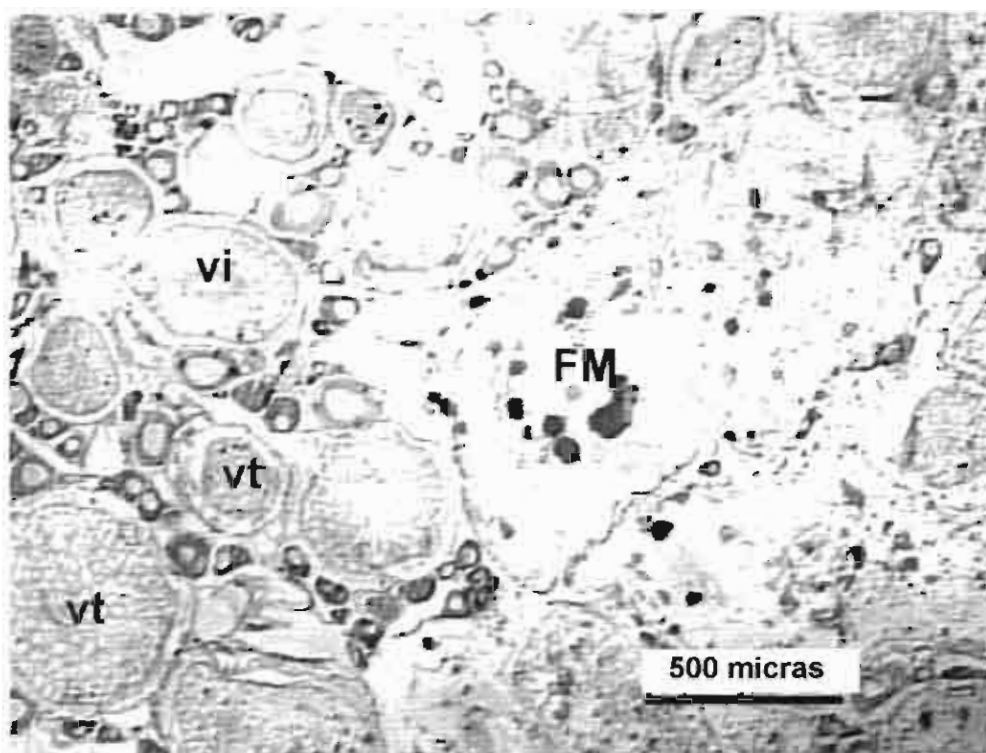


Figura 24. Se muestran los folículos en estados vitelino y maduro: tempranos (Vt), intermedios (Vi) y tardíos (VT), se aprecia de igual forma algunos maduros (FM). La barra = 500 micras HE, 32 x.

Folículo maduro (FM). Este estado, está caracterizada por la reanudación de la migración del núcleo al polo animal, donde se puede apreciar que este se une con la pared del ovocito y desaparece (Figura 21 y 23 E). Los depósitos de material acidófilo hacia la superficie dejan de ser evidentes y el corión se encuentra totalmente formado. Los filamentos o zarcillos, son apreciables en esta fase con reacción acidófila y el folículo experimentó un incremento en su tamaño hasta alcanzar $598.44 \pm 121.5 \mu$ ($n = 100$).

En la figura 25, se esquematiza el proceso de desarrollo de la ovogénesis en el pez blanco, donde se muestran los folículos en sus diferentes estados de desarrollo (EDF). Las dimensiones se representan a escala, considerando las diferencias entre el tamaño de cada estadio.

Resultados

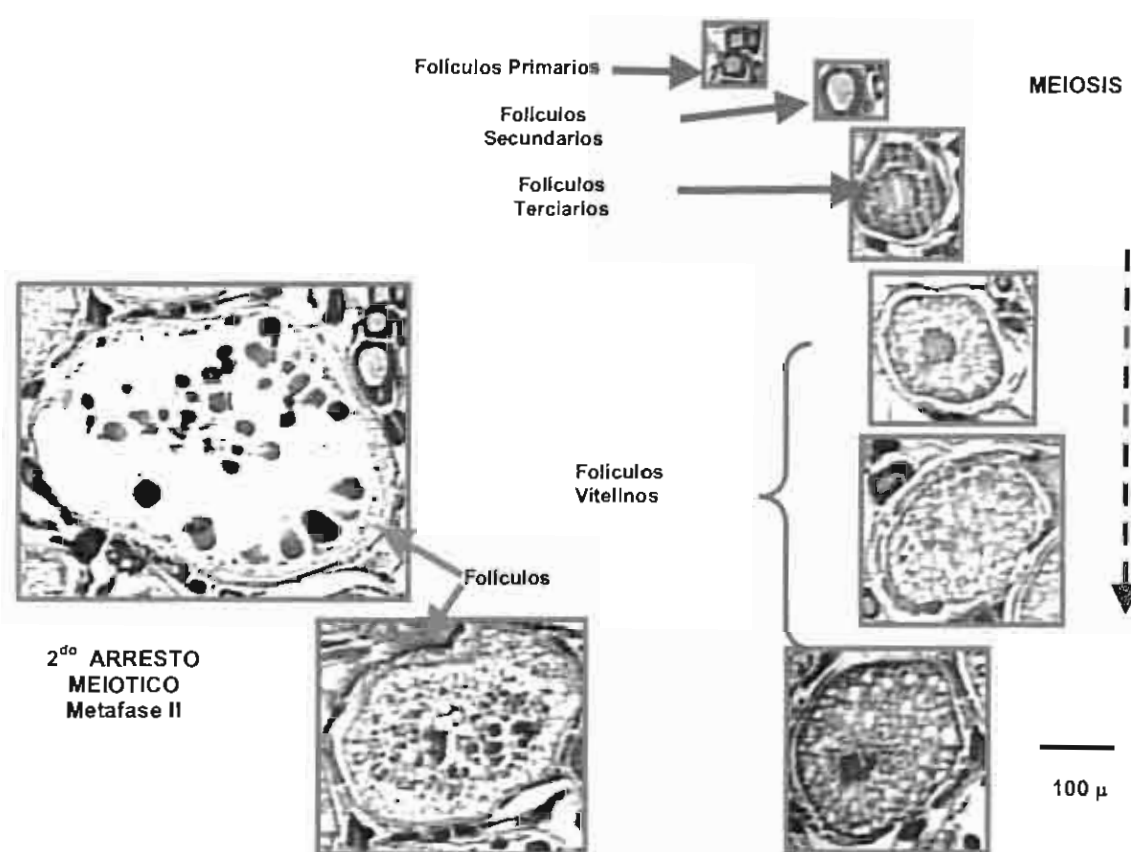


Figura 25. Representación esquemática del proceso de ovogénesis en el pez blanco *Chirostoma humboldtianum*, se observan los distintos estadios de desarrollo.

Teóricamente, el desarrollo de la ovogénesis inicia cuando el ovocito entra en división meiótica aún estando en el epitelio germinal, posteriormente, sufre el primer arresto meiótico durante la etapa previtelogénica; sin embargo, continúan los cambios morfo-funcionales. Posteriormente, cuando termina la vitelogénesis se reinicia la meiosis y procede el segundo arresto meiótico antes de ser ovulado (Figura 25). Al momento de la ovulación, se experimenta el mayor crecimiento del ovulo.

La población folicular, se presentan en la tabla 12, no existió diferencia significativa ($p \leq 0.05$), entre ambas épocas con respecto a la composición folicular comparando a hembras de similar EMO.

Resultados

Tabla 12. Valores promedio y desviación estándar ($\pm$) del porcentaje de cada Estado de Maduración Ovárica (EMO), durante la temporada de ovodepositaciones del pez blanco, *Chirostoma humboldtianum*.

EMO	n	Porcentajes				
		FP	FS	FT	FV	FM
I	13	40 $\pm$ 3,0	43 $\pm$ 4,0	16 $\pm$ 2,0	1 $\pm$ 0,3	0
II	7	32 $\pm$ 5,0	39 $\pm$ 2,0	19 $\pm$ 1,0	7 $\pm$ 1,0	3 $\pm$ 1,0
III	4	42 $\pm$ 7,0	22 $\pm$ 3,0	15 $\pm$ 2,0	15 $\pm$ 2,0	6 $\pm$ 1,0
IV	6	35 $\pm$ 4,0	19 $\pm$ 3,0	14 $\pm$ 3,0	21 $\pm$ 2,0	11 $\pm$ 2,0

n = tamaño de muestra; FP = Folículo primario; FS = Folículo secundario; FT = Folículo terciario; FV = Folículo vitelino y FM = Folículo maduro.

Esta especie mostró una correspondencia entre el desarrollo macroscópico del ovario (EMO) y su estructura microscópica (Figura 26). Para la fase de descanso reproductivo, al momento de ser sacrificadas las hembras, los ovarios mantuvieron su dimensión, peso, grosor, valor de IG y composición folicular característica del EMO que tenían cuando finalizó la temporada de desoves, con la única diferencia de que mostraron signos característicos de gónadas desovadas como textura rugosa y opaca. Sin embargo, en todo momento se mantuvo congruencia entre la composición estructural de la población folicular a nivel histológico, con el grado de desarrollo macroscópico del ovario, siendo similar por lo tanto para ambas temporadas.

Las imágenes histológicas de la sección media del ovario de cada una de los cuatro EMO con su composición folicular en la época de reproducción, mostraron que en todos los EMO, los ovarios presentaron un reclutamiento constante de folículos primarios, y de población folicular que caracterizó a cada EMO y sobre todo a la actividad sexual del organismo, conforme a la época de actividad reproductiva.

En las hembras con EMO I, existió una dominancia de ovocitos pre-vitelinos, donde los folículos primarios y secundarios destacan por su mayor frecuencia, seguidos por los folículos terciarios. De igual forma, se aprecia un incipiente inicio del proceso de la foliculogénesis, caracterizado por la presencia de algunos folículos vitelinos en las gónadas (1%) (Tabla 12 y Figura 26 A).

Resultados

El EMO II, estuvo caracterizado por el inicio del proceso de la vitelogénesis, con pocos folículos maduros y un incremento en su tamaño. Los folículos pre-vitelinos continúan siendo dominantes (Tabla 12 y Figura 26 B).

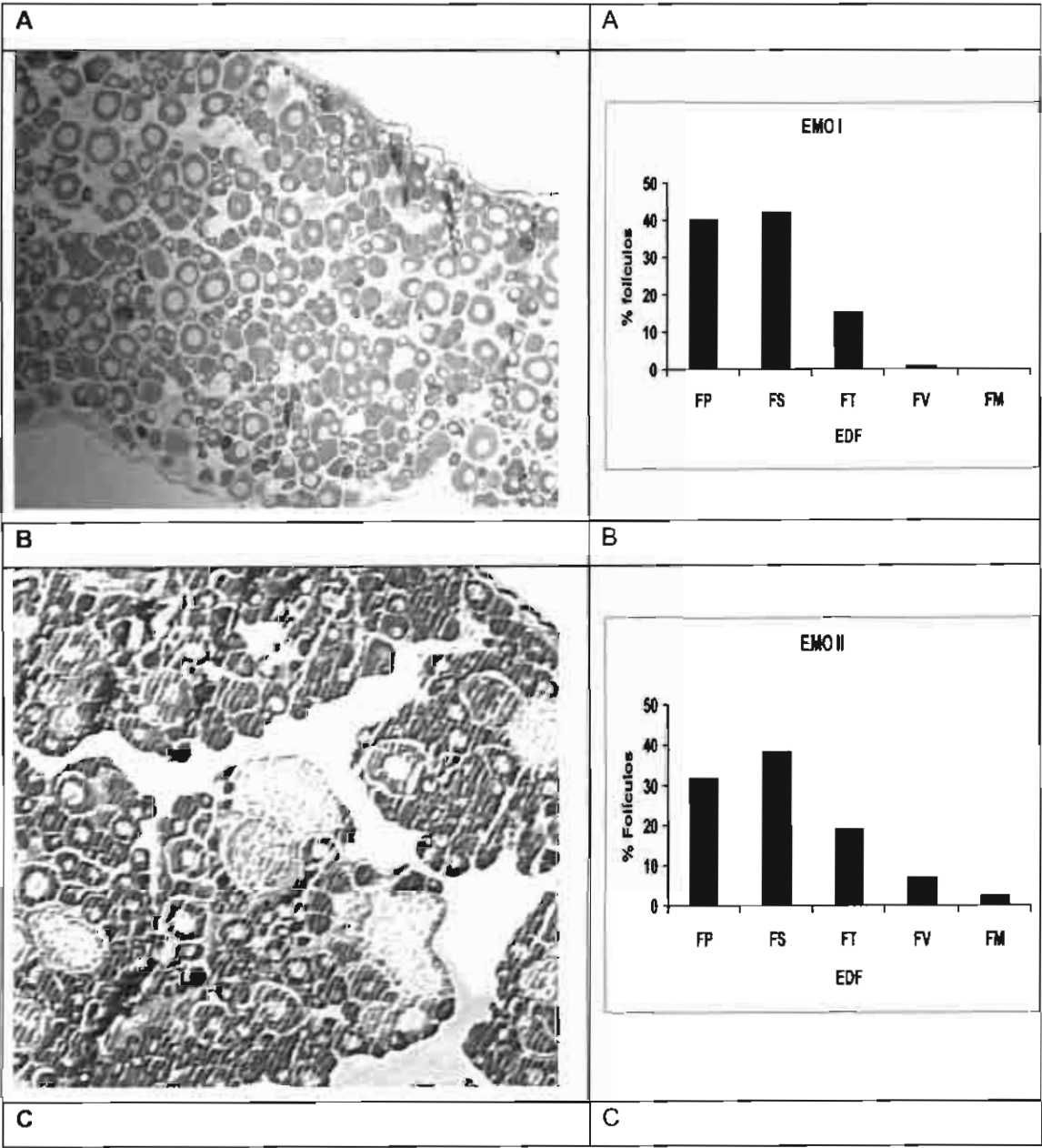
En el estadio III, se observó el proceso gradual de la ovogénesis con un incremento en el porcentaje de los folículos vitelinos (15.66%) y el inicio del reclutamiento de los folículos maduros (6%) (Tabla 12 y Figura 26 C).

En el estadio IV, se mostró un perfil histológico que estuvo caracterizado por una población folicular compuesta por todos los estadios y por la presencia de folículos vitelinos y maduros (Tabla 12 y Figura 26 D).

Finalmente, el análisis histológico demostró una correspondencia directa entre el EMO y la composición de la población folicular conforme al avance del proceso de ovogénesis. La presencia de folículos atrésicos, no reflejó un patrón definido, observándose algunos en forma esporádica, sin importar el EMO, ni de la época (Figura 23 A).

Concentración de las hormonas circulantes 17 β -Estradiol (E₂), y a 17 α -hidróxi-progesterona (17-P₄).

Los niveles de esteroides sexuales circulantes obtenidos en el presente trabajo, se presentan en la tabla 11. Los valores oscilaron de 1.17 ± 0.19 y 7.59 ± 2.15 ng/mL para el E₂; mientras que para la 17-P₄, fluctuaron de 0.84 ± 0.17 a 2.39 ± 0.28 ng/mL en la época reproductiva. Para la temporada descanso reproductivo, los valores fluctuaron entre 1.54 ± 0.60 y 1.91 ± 0.0 ng/mL y de 1.34 ± 0.47 a 1.86 ± 0.53 ng/mL para el E₂ y la 17-P₄ respectivamente.



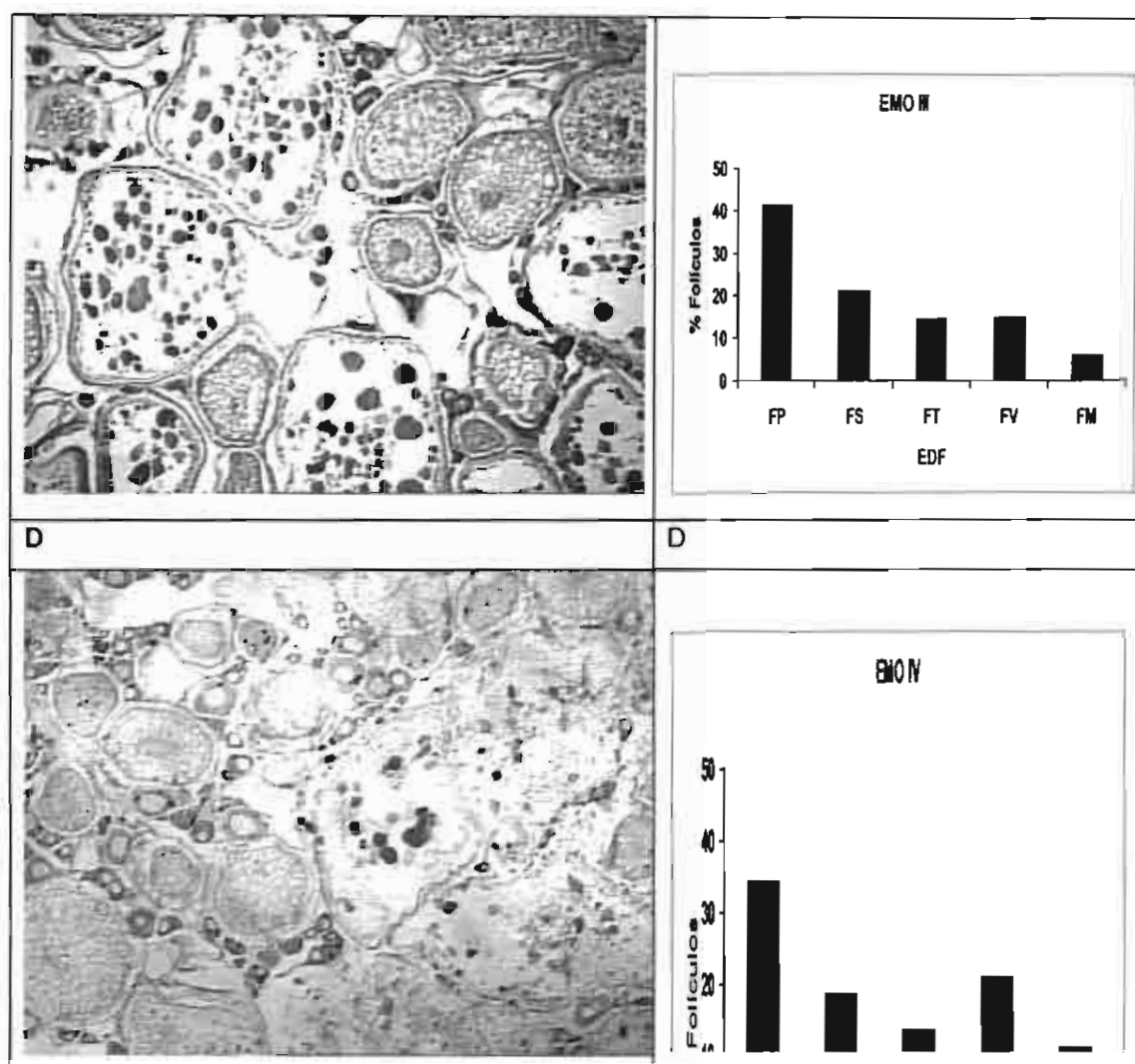


Figura 26. Perfiles histológicos (HE, 32X) y sus respectivos porcentajes de frecuencias por Estados de Desarrollo Folicular (EDF), en relación al EMO.

En la figura 27A, se muestran los niveles circulantes de estas hormonas en la época reproductiva. El estradiol, presentó valores significativos en las hembras con escaso desarrollo gonadal (EMO I), posteriormente, se observa una disminución en hembras con EMO II y conforme avanza el grado de madurez sexual (EMO III y IV), la concentración del E_2 en el plasma se incrementó, hasta alcanzar valores máximos de 7.56 ± 2.15 ng/mL. Para el caso de la $17-P_4$, se observó una conducta similar con una alta

Resultados

concentración en etapas de maduración tempranas (2.38 ± 0.28 ng/mL); estos niveles fueron siempre menores que los niveles del E₂.

Tabla 13. Niveles promedio de 17β-Estradiol (E₂), y de la progestina 17α-hidróxi-progesterona (17-P₄), durante las épocas de reproducción y descanso reproductivo, por Estado de Madurez Ovárica (EMO).

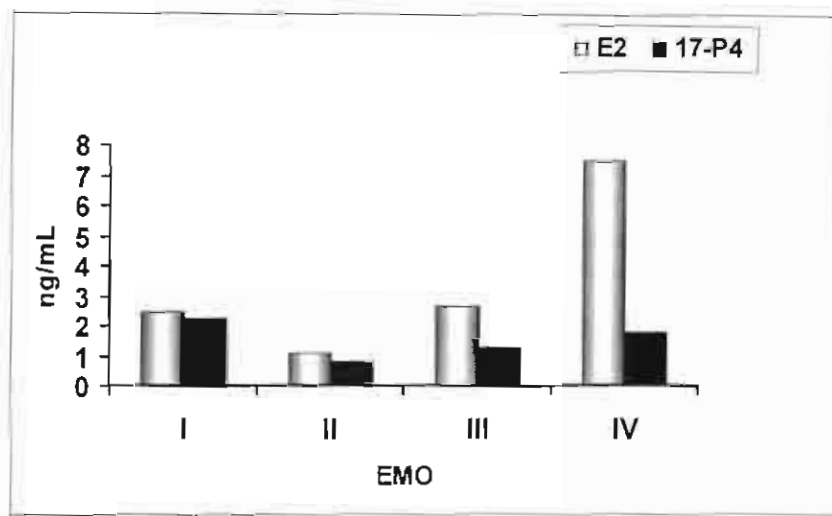
EMO	(n)	Época de reproducción (ng/mL)		(n)	Época de descanso reproductivo. (ng/mL)	
		E ₂	17-P ₄		E ₂	17-P ₄
I	13	2.50±0.69	2.39±0.28	3	1.9±1.36	1.86±0.53
II	7	1.17±0.19	0.84±0.17	13	1.54±0.60	1.34±0.47
III	4	2.76±0.63	1.36±0.51	4	1.91±0.0	1.58±0.0
IV	6	7.56±2.15	1.80±0.90	0	a	a

n = tamaño de muestra; a = ausente.

En la Figura 28, se muestra el gráfico de cajas y bigotes donde se indican las fluctuaciones de los niveles hormonales encontrados, para ambas temporadas y conforme al estado de madurez ovárica. Se observó, que la conducta hormonal es similar, si se comparan a las hembras con estados similares de desarrollo. Si bien, y como ya se mencionó, en la segunda temporada, todos los EMO fueron de pos-desove (V) y las hembras, mostraron diferente grado de desarrollo, equiparable a tres primeros EMO de la temporada de reproducción. La figura mostró la presencia de hembras maduras en la temporada de ovodepositaciones y que en términos generales, no hubo diferencias significativas entre los niveles ($p \leq 0.05$) para ambas épocas. En los peces con ovarios pequeños (EMO I), los niveles disminuyeron en el EMO II, para posteriormente experimentar un incremento el EMO III.

En la temporada de reposo reproductivo, la conducta de ambos esteroides, no mostró una tendencia definida, pero se puede observar que las hembras después de sus múltiples desoves, aún conservan en sus ovarios actividad esteroidogénica; las hembras presentando niveles superiores a los 1.5 ng/mL de E₂ (Figura 27B).

A



B

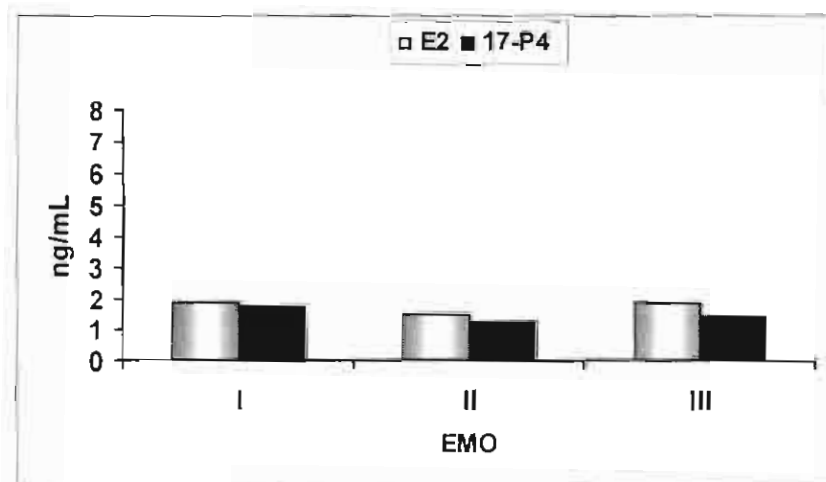


Figura 27. Niveles promedio de 17β -Estradiol (E₂), y 17α -hidróxiprogesterona (17-P₄). A) durante la época reproductiva; B) durante la época de descanso, asociados al Estado de Madurez Ovárica (EMO).

Resultados

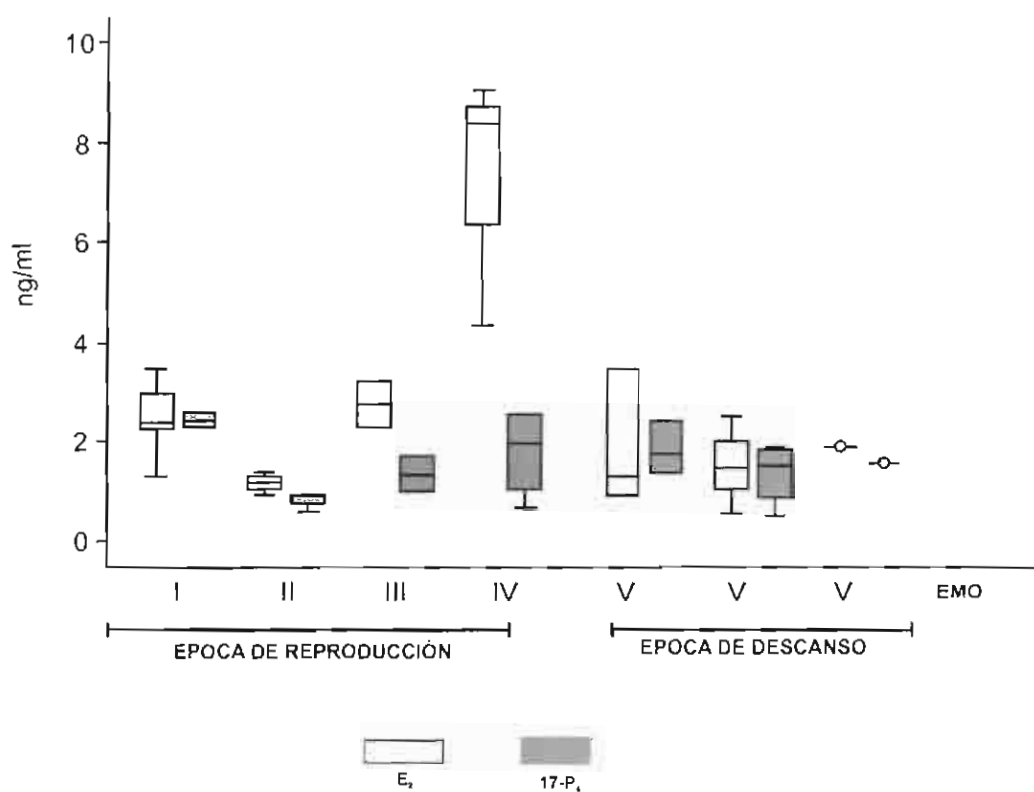


Figura 28. Fluctuaciones de los niveles hormonales de 17-E₂ y de 17-P₄, por EMO (I, II, III, IV), en ambas épocas.

DISCUSION

El principal aporte de la presente investigación, fue el seguimiento en cautiverio del primer ciclo reproductivo de una población F1 del pez blanco *C. humboldtianum*, en el cual, fue posible conocer algunos principios anatómico-fisiológicos de la primera maduración sexual, de la primera actividad reproductiva y de su periodo de descanso. Esta información, puntualizó y clarificó algunos aspectos que se desconocían, y que arrojaron información valiosa sobre la historia de vida de estos organismos.

Época de reproducción y primera edad reproductiva.

Los peces en estudio, nacieron en los meses de marzo, abril y mayo del 2002, lo que permitió contar con información necesaria para conocer la edad exacta de los organismos. Informes recientes (Paulo-Maya, *et al.*, 2000; Moncayo, *et al.*, 2003), mencionan que, en su ambiente natural (Presa Las tazas, Municipio de Jocotitlán, Estado de México) y particularmente en éste sitio que es el lugar de procedencia de los progenitores, esta especie se empieza a reproducir cuando alcanzan una talla de 9 cm de longitud total, y presumiblemente a los 11 meses de edad. Lo cual fue comprobado en esta investigación, pero además la información puntualiza varios aspectos discutidos a continuación.

Evidencias anteriores mencionan que las tallas de reclutamiento reproductivo y fecundidad varían con el sitio de origen. Por ejemplo, en la Presa Huapango, Estado de México, se reporta, que para los machos la talla es de 72 mm y para las hembras de 84 mm, con una fecundidad absoluta que va de los 9,136 a 19,489 óvulos (Moncayo *et al.*, 1983; Téllez-Pérez, 1985). En la Laguna de Zacapu, Estado de Michoacán, para los machos el tamaño mínimo se ubica entre los 71.1 y 110 mm en tanto que para las hembras está entre los 106 y 130 mm, la fecundidad absoluta se encuentra entre los 3,369 y 3,419 óvulos (Mendoza *et al.*, 1995). Para la Presa Cointzio, Estado de Michoacán, la talla mínima de reclutamiento reproductivo está entre los 81 y 90 mm para ambos sexos (Moreno, 1993); mientras que para el embalse Las Tazas, Estado de México, la talla mínima de reproducción es a los 57 mm; lo cual a mi juicio considero que

éste dato corresponde a los machos y no a las hembras, en virtud de que en ese reporte no se aclara, además se menciona que las hembras analizadas presentaron una fecundación absoluta observada entre los 2,042 y 17,758 óvulos (Aguilar y Navarrete, 1996; Paulo-Maya, 2000). En ninguno de los trabajos anteriores se conoce la edad de los peces, siendo una de las debilidades en los trabajos de biología pesquera. Ramírez (2006), mencionó que la primera edad reproductiva, podría variar a causa de distintas condiciones, como podrían ser entre otras, la cantidad de alimento disponible en su hábitat natural.

En la mayoría de los informes existentes, se menciona una talla mayor para las hembras en el primer evento reproductivo, lo que podría sugerir erróneamente que tienen una tasa de crecimiento mayor, al inferir que ambos tendrían la misma edad. Con los resultados obtenidos en esta investigación (Tablas 5 y 6), se pone de manifiesto que las mayores tallas de primera reproducción en las hembras, se debe a que éstas maduran a mayores edades y no solo porque presenten un ritmo de crecimiento mayor.

En este trabajo, se precisó la edad exacta en que presentan su primera actividad reproductiva en condiciones de cautiverio. Los machos maduran sexualmente a edades más tempranas, en comparación con las hembras. Además, se observó, que éstos presentan madurez sexual desde los nueve meses de edad, lo anterior al arrojar semen con una presión abdominal al momento del sexado. En cambio, a través de los registros de los desoves, se conoció que la primera edad reproductiva en las hembras, es a los 12 meses; lo que podría constituir parte de la estrategia reproductiva, para asegurar la presencia de reproductores machos al momento de las primeras ovodepositaciones.

Al respecto, la actividad reproductiva de las tres cohortes, confirma que *C. humboldtianum* inicia su reproducción en enero y febrero (Figura 8 y Tabla 5). La primera cohorte, inició su reproducción en el mes de marzo, lo cual coincidió cuando las hembras tenían un año de edad, en ella los machos desde tres meses atrás ya presentaban líquido espermático, lo cual indicó la presencia de machos maduros para asegurar la fecundación en caso de alguna ovodepositación esporádica. En lo que respecta a las dos cohortes restantes, éstas registraron su primera actividad reproductiva cuando alcanzaron casi los

Discusión

doce meses de edad (11 meses 3 semanas), independientemente de su peso y su longitud.

Uno de los primeros registros de la edad de reproducción de hembras en cautiverio del pez blanco *Chirostoma estor estor*, es el de García de León (1984), quién menciona que la primera edad de reproducción de las hembras fue de los 11 a 12 meses de edad. Esto confirma, que la primera reproducción es al año de edad en condiciones de cultivo.

Con respecto a la época reproductiva para el pez blanco, los registros (Moncayo *et al.*, 1983; Sánchez, 1992; Sasso *et al.*, 1997; Paulo-Maya *et al.*, 2000; Gonzáles-Barajas, 2002; Blancas, 2002; Blancas *et al.*, 2003 y 2004; Ramírez, 2006), indican que su temporada de desoves es amplia y abarca desde noviembre hasta mayo, de febrero a julio y de enero a agosto, dependiendo del cuerpo de agua donde se encuentre y de las especies de pez blanco que se trate. Sin embargo, los informes no son claros ni consistentes, y por lo tanto, aún existe la controversia en cuanto a si estas poblaciones, presentan una o dos temporadas reproductivas. Al respecto, Moncayo *et al.* (2003), describieron distintos tiempos de reproducción para las tres especies de peces blancos las cuales cohabitan en la Laguna de Chapala estados de Jalisco y Michoacán, Así por ejemplo *Chirostoma lucius*, tiene una época que comprende de enero a abril, *Chirostoma sphyraena*, ovodeposita entre los meses de octubre a enero, y *Chirostoma promelas* lo hace de noviembre a febrero. Aunque existen controversias, ya que Paulo-Maya (2000) indica para el caso de *C. lucius*, un periodo reproductivo que se inicia al final de la época fría del año que va de diciembre a febrero, pero su máximo reproductivo se alcanza durante los primeros meses del año. Torres, (1978), Arregui, (1979) y Paulo- Maya, (2000), mencionan que *C. sphyraena* y *C. promelas*, tienen su actividad reproductiva durante el periodo de mayo a agosto y empiezan a desovar cuando alcanzan los dos años de vida. Otras referencias, mencionan que la reproducción de *C. estor estor* del Lago de Pátzcuaro, Estado de Michoacán, ocurre todo el año, con un máximo de febrero a mayo (Rosas, 1970; Rosas-Monge, 1994; Segura, 1997).

La información antes referida presenta alguna coincidencia para *C. humboldtianum*, de la Presa Huapango, Estado de México. Moncayo *et al.* (1983); Flores

Discusión

(1985), mencionan que las hembras maduran todo el año, pero se observa un pico reproductivo de marzo a agosto en este embalse. En la Laguna de Zacapu, Estado de Michoacán, la temporada reproductiva es amplia (Palacios-Saucedo, 1998), pero su pico se presenta en enero (Mendoza *et al.*, 1995). En la Presa Villa Victoria, Estado de México, se identificaron dos periodos reproductivos, de mayo a junio y de enero a marzo (Villagómez *et al.*, 1997); en el embalse Cointzio, Estado de Michoacán en cambio, la época reproductiva va de marzo a noviembre, siendo más intensa en los últimos tres meses del año (Moreno, 1993), mientras que, en la Presa Danxho, Estado de Michoacán, solo se reproducen en los meses de primavera (Navarrete, 1994; Paulo-Maya, 2000).

Estos datos concuerdan, que se presenta una temporada reproductiva larga e intensa durante la primera parte del año, y posiblemente una pausa (lo que fue comprobado con este estudio), más que una segunda época de reproducción. A juicio del que suscribe, la variación de las épocas del año, obedece a que estas poblaciones de peces blancos presentan estrategias reproductivas de acuerdo a las distintas condiciones ambientales para asegurar su éxito ecológico. Particularmente, las condiciones de cultivo durante la presente investigación (Tabla 4), coinciden con condiciones ambientales de los hábitats naturales para estos peces, además de que históricamente esta especie habitaba los sistemas lacustres de la Cuenca de México, sitio donde se desarrolló el presente trabajo.

Los estudios en biología pesquera realizados en el Estado de México, ponen de manifiesto que la reproducción de *C. humboldtianum*, ocurre casi todo el año, con dos picos reproductivos: el primero se alcanza hacia la primavera y el segundo en el verano y otoño. Si bien, fué posible encontrar organismos sexualmente maduros, (Aguilar-Ponce, 1993; Navarrete, 1994; Aguilar y Navarrete, 1996), se deduce que estos no se reproducen, debido a que no se detectó ningún reclutamiento en el cuerpo de agua, y que las hembras mantenían su desarrollo sexual, lo que no se explicaba hasta antes de esta investigación (analizado más adelante). En la Presa Las Tazas, un estudio histológico, registró una alta incidencia de ovocitos atrésicos en el mes de mayo, lo que indicaría aparentemente la parte final de la época de desoves y donde se consideró que la actividad reproductiva fue máxima en los meses de febrero, marzo y junio (González-Barajas, 2002). Por lo anterior, existió coincidencia al señalar el inicio de la época

Discusión

reproductiva con el advenimiento de la primavera, particularmente cuando finaliza el invierno, momentos característicos de un cambio en las condiciones ambientales, principalmente de luz y temperatura. Esto último enfatiza el papel que tienen estos factores en *C. humboldtianum*, como estimulantes para el mecanismo reproductivo, demostrado en los trabajos de Blancas (2002) y Blancas *et al.* (2004).

La época reproductiva del pez blanco registrada en la PExPA en el 2003, inició el 28 de enero y concluyó el 15 de agosto, lo que representó una amplia y única época de actividad sexual de más de seis meses, coincidiendo con los antecedentes en las mismas condiciones (Blancas y colaboradores 2003 y 2004); estos autores mencionaron que la temporada reproductiva del 2002 observada en cautiverio, duró cinco meses, de febrero a julio. La sincronización de la época reproductiva entre los peces nacidos en cautiverio con respecto a las poblaciones en su ambiente natural, respaldó por lo tanto la hipótesis de que los organismos obedecen a ritmos biológicos endógenos, marcado por sus ciclos neuro-endócrinos y programan sus procesos reproductivos entre otras funciones vitales (Munro, 1990).

En diversas referencias (Aida, 1988; Munro, 1990; Evans 1995; Moyle y Cech, 2000), se ha puesto de manifiesto que la actividad reproductiva en la mayoría de los peces Teleósteos, está controlada de forma endógena por éste ritmo o reloj biológico, el cual, es estimulado por los cambios ambientales, sobre todo por la temperatura y la luz. Aida (1988), menciona que se ha demostrado en los Ciprínidos, el efecto que tiene el incremento de la temperatura del agua y su acción sinérgica, con un cambio de horas luz, en la respuesta fisiológica de los peces, y señala que estas condiciones provocan un aumento en el nivel de las Gonadotropinas (GtH) circulantes, lo que a su vez coincide con un incremento de la hormona testosterona, la maduración final de los folículos y finalmente la ovo-depositación. Este efecto estimulante de la combinación entre luz y temperatura fue comprobado en *C. humboldtianum* por Blancas *et al.* (2004) con uso de los ciclos fototérmicos artificialmente comprimidos.

Los trabajos en condiciones de cautiverio, si bien no consideran una visión ambiental completa, si puntualizan los detalles para conocer algunos aspectos particulares y tienen especial importancia para explicar los procesos fisiológicos. Los

resultados en este trabajo, destacan principalmente que las hembras de mayor tamaño sostienen la época reproductiva y las más pequeñas, solo participan en forma discreta. También, se mostró la participación activa de las hembras con mayor edad durante toda la etapa reproductiva, delegando a las más jóvenes durante los meses de actividad reproductiva. Esta situación, se puede explicar de acuerdo con los resultados obtenidos por Zou *et al.* (1997) y Kwon (1997), quienes encontraron que la síntesis de la vitelogenina por los hepatocitos, pudiera estar directamente influida por una recíproca estimulación de la hormona de crecimiento, la somatotropina y la prolactina. De acuerdo con lo anterior, en el presente estudio, las hembras de mayor talla fueron las que efectivamente presentaron una mayor actividad endocrina que las más jóvenes y consecuentemente una mayor actividad y capacidad reproductiva. Al respecto, Kelly y Kohler, (2000), en estudios realizados con el híbrido de tilapia (*O. niloticus* x *O. aureus*), encontraron que la hormona de crecimiento está implicada en la regulación de las funciones gonadales, y que esto se refleja en las concentraciones séricas del estradiol, atribuido posiblemente a un factor liberador de la hormona de crecimiento presente en peces Teleósteos.

En la presente investigación se observó una etapa de pausa reproductiva en las hembras de mayor talla (Figura 8), lo que coincide con lo encontrado recientemente por González-Barajas (2002) y Ramírez (2006), quienes ponen de manifiesto una interrupción de la actividad reproductiva en ésta especie. Según estas referencias, la reproducción se inicia a finales de febrero y algunas hembras interrumpen su reproducción en mayo, pero otras, la continúan hasta mediados de julio. Lo anterior, podría atribuirse al gran desgaste metabólico provocado por el esfuerzo reproductivo, los consecuentes cambios hormonales ocasionando una retroalimentación endocrina negativa, y como consecuencia la falta de ovulación.

Concretamente, con los resultados obtenidos, se apoya la existencia de una sola época reproductiva, que es sostenida principalmente por las hembras de mayor tamaño, quienes presentan una pausa para reanudar posteriormente sus desoves, lo que se interpreta por otros autores como dos épocas de reproducción. La población de hembras más jóvenes y de menor talla, contribuyen a sostener una larga época reproductiva en el pez blanco.

Indicadores de madurez gonádica.

Los diagramas de escalera (Figura 9), mostraron una conducta distinta entre las épocas de ovodepositación y descanso reproductivo. Se encontró, una correlación lineal entre el peso del ovario y el peso del hígado, en la etapa reproductiva; mientras que, en la época de descanso, no existió. Lo anterior, mostró una relación anatómica funcional de la producción cada vez mayor de vitelo por parte del hígado y el proceso de maduración y crecimiento de la gónada. Zou *et al.* (1997) y Kwon, (1997), subrayan que: durante la ovogénesis, se incrementa la producción de hormonas sexuales como el estradiol, que interviene de forma directa en el metabolismo de la producción de la vitelogenina por parte del hígado, proteína necesaria para formar el vitelo que se acumula a su vez en los folículos, incrementando el peso de los ovarios

La reproducción impone una demanda metabólica en los peces Teleósteos. Este proceso, se ve reflejado en el índice gonadosomático (IG), el cual, por lo general indica la estrategia reproductiva de los peces (Tyler y Sumpter, 1996). En estos términos, la clasificación de maduración ovárica propuesta aquí para los peces blancos, se basó en los valores del IG, por ser un buen indicador de la actividad reproductiva. Rodríguez (1992), indica que el IG no es definitivo, pero si específico para ser utilizado como un indicador del estado fisiológico y de las características fenotípicas reproductivas en los peces. Este valor se torna importante, ya que alcanza valores elevados antes del desove en las especies con un patrón de desarrollo ovárico sincrónico, y valores pequeños durante la época de descanso reproductivo o bien en la fase de pos-desove. Los valores de IG en hembras maduras con un patrón sincrónico, usualmente se encuentra entre los 18 y 25, pero en muchas investigaciones exceden de los 40, como por ejemplo, en las especies *Anguilla japonica* (Familia Anguillidae) y *Spirininchus thalichthys* (Familia Osmeridae) (Chigby y Sibley, 1994). Los valores de IG en hembras con maduración asincrónica los valores son generalmente bajos, y oscilan en la época reproductiva entre dos y 10, dependiendo de la especie. En especies que ovulan y desovan en varias ocasiones durante su temporada reproductiva, este valor también fluctuará conforme al número de eventos ocurridos. El intervalo de valores del IG, menor de ocho encontrado en *C. humboldtianum* sugiere su clasificación como una especie asincrónica.

Discusión

Sin embargo, los desoves constantes encontrados en esta investigación, indican la presencia de hembras con distinta composición folicular a lo largo de la temporada reproductiva, en virtud de que al ser liberados los ovocitos maduros, otros folículos continúan con el proceso de ovogénesis, que es característico de los organismos de tipo sincrónico por grupos, de acuerdo con Tyler y Sumpter (1996). Los datos histológicos y el patrón de desoves observado, y con base a la descripción propuesta por Pankhurst (1998), sugiere que el pez blanco, sea considerado como una especie sincrónica por grupos con desoves múltiples, a pesar de sus bajos valores de IG. Por lo anterior, para definir el patrón del modelo reproductivo y de desarrollo ovárico en peces Teleósteos, se sugiere emplear necesariamente un análisis histológico y no únicamente basarse en los valores del IG.

El IG es y ha sido, un excelente parámetro para diagnosticar el desarrollo sexual expresado en el incremento de la gónada con respecto al peso corporal, y en su uso, se fundamenta la propuesta y construcción inicial de grupos con diferente grado de maduración ovárica. En la Figura 10, se observa, que los datos del IG se pueden agrupar perfectamente en los cuatro grupos propuestos, y que entre ellos, existen diferencias significativas, lo que respalda la validez estadística de dicha clasificación. Al respecto, y tal como lo menciona Salgado-Ugarte (1992), el Análisis Exploratorio de Datos (AED), resulta adecuado para explorar los valores numéricos y centrar la atención en sus características prominentes, permitiendo que los datos mismos sirvan de guía en la elección de modelos apropiados. La separación y diferencia estadística de los valores presentados de IG por las hembras en cuatro grupos en la época reproductiva, constituyó el fundamento que permitió caracterizar cuatro Estados de Madurez Ovárica (EMO) del I al IV en la fase reproductiva y una más en la de descanso (V). Lo que posteriormente fue respaldado por las observaciones histológicas.

Durante la época reproductiva, se presentaron los cuatro EMO, indicando que el proceso de la ovogénesis se desarrolla en esos momento, se destaca la presencia de hembras con valores de IG máximos reportados por otros autores en la época de desoves para varios cuerpos de agua (Torres, 1978; Navarrete, 1994; Aguilar y Navarrete, 1996; Paulo-Maya, 2000), mientras que para la época de descanso reproductivo sólo se presenta el EMO V, si bien, estas hembras presentaron valores de IG similares a los tres

Discusión

primeros EMO de la fase reproductiva, todas tenían ovarios en recrudescencia, y además fue notoria la ausencia de hembras con IG altos (IV) que indicaran actividad de desove.

A diferencia del IG, el IH, no mostró una aparente relación durante todo el estudio. Lo anterior, se debió a la constante actividad de desove en la fase reproductiva. Tyler y Sumpter (1996), mencionan que las especies con desarrollo asincrónico de sus ovocitos, presentan una constante actividad hepática en la producción de la vitelogenina, en virtud del constante reclutamiento de los ovocitos pre-vitelinos y vitelinos después de la puesta. Lo anterior se observó en las preparaciones histológicas, tanto en la época reproductiva como en la fase de descanso, en virtud de que las hembras mostraron en todo momento ovocitos en fase vitelina.

Estados de Maduración Ovárica y construcción de una Escala Empírica para el pez blanco.

Las escalas empíricas se establecen con base a la maduración de los productos sexuales y al crecimiento de las gónadas en la cavidad visceral. En la mayoría de las especies, el ciclo reproductivo es anual, pero en otras sobre todo en ciertas especies migratorias es bianual o mayor, como por ejemplo en el esturión. La estrategia reproductiva también varía, si se trata de especies con desarrollo sincrónico, sincrónico por etapas o bien asincrónico. Esto hace, que el periodo de desarrollo varíe considerablemente en diferentes especies, lo que ha dado como resultado un gran número de escalas para explicar el ciclo reproductivo de algunos grupos de peces, como por ejemplo la escala de Poulsen para Gádidos, la de Heincke–Mayer para Pleuronéctidos, la de Nedoshiving para esturiones; la de Kulaev y Meien para Ciprínidos y Percas, la de Clark para sardina y la de Buckman para la mayoría de los Teleósteos. Todas ellas, están basadas en indicadores universales, que es el crecimiento y la maduración de las gónadas (*fide*: Rodríguez, 1992).

Dentro de las escalas empleadas comúnmente, destacan las elaboradas por Kesteven (1960), que es una escala muy general y poco específica; en ella, establece siete estados y aplica términos como: virgen, en desarrollo, desove, entre otros. La de Nikolsky (1963), es una de las más comunes, con seis etapas similares (*fide*: Rodríguez,

op. cit.). Estas escalas, proporcionan criterios morfológicos y diversos y son empleadas con mayor frecuencia, tanto para especies marinas como de agua dulce.

Rosas (1981), describe una escala de maduración para algunas especies de agua templadas mexicana, que fue utilizada principalmente para algunos Ciprínidos. Se tiene el antecedente de la descripción que hace Solórzano en 1961, para el proceso de maduración gonadal de *Chirostoma estor estor* en el Lago de Pátzcuaro, Estado de Michoacán. También se cuenta con las aportaciones valiosas en el uso de escalas de maduración sexual aplicadas a Aterinópsidos por García de León (1984) y Figueroa, (2006), donde incorporan datos referentes al tamaño de los ovocitos encontrados en los ovarios. Sin embargo, estos esfuerzos son aislados y poco contundentes, al trabajar con organismos de edad desconocida y carecer de información en cuanto al historial de la actividad reproductiva de estos peces. La revisión de Paulo-Maya (2000) y los trabajos recientes de Figueroa *et al.* (2003) y Ramírez (2006), son contribuciones importantes y actualizadas para definir el proceso de maduración gonádica en peces blancos.

Las clasificaciones realizadas hasta el momento, coinciden en lo general con la elaborada por Solórzano. La propuesta realizada en este trabajo, incluye aspectos nuevos y agrupa a los ovarios en fases de maduración, que se pueden distinguir perfectamente, incluyendo registros de la biometría de los ovocitos y observaciones histológicas del proceso de la ovogénesis y la foliculogénesis. La escala empírica de Desarrollo Ovárico propuesta, presentada en este trabajo, destaca que las cinco fases de desarrollo presentan diferencias significativas en la apariencia y son perfectamente identificables, basadas como ya se mencionó, en los valores significativamente distintos de sus respectivos IG, además, respaldados por el porcentaje de espacio visceral (PEV) que ocupan los ovarios en la cavidad visceral y la apariencia de las mismas.

La estrategia reproductiva del pez blanco, por tratarse de hembras con desarrollo clasificado inicialmente como sincrónico por grupos (Figueroa, 2006), y considerado en el presente trabajo como *sincrónico por grupos con desoves múltiples*, indica cambios en la secuencia de estados de desarrollo folicular en el ovario. La escala propone cuatro EMO básicos: Inmaduro (I), Madurez Temprana (II), Crecimiento Ovárico (III) y Desove (IV). Se destacó la tinción que experimenta la túnica albugínea de los ovarios durante el proceso

Discusión

de maduración y las tonalidades que van de claros a café oscuro, hasta llegar a negras con marcada brillantez debida a la aparición de melanóforos en la cubierta de la gónada femenina. Con base a la información de trabajos en biología pesquera, se maneja que sólo los ovarios maduros presentaban esta coloración, pero se desconocía si eran ovarios de hembras con uno o varios ciclos reproductivos. La presente investigación, aclara que los ovarios adquieren esta coloración en la primera maduración y no la pierden ni en la época de recuperación sexual. Por lo anterior se presenta esta Escala Empírica de Madurez Ovárica para ser aplicada en las cinco especies de peces blancos.

Histología ovárica y ovogénesis.

Coincidiendo con la información bibliográfica publicada para ésta especie (González-Barajas, 2002; Paulo-Maya *et al.*, 2000; Moncayo, 2003), y con base a las observaciones realizadas en el presente trabajo, los ovarios del pez blanco se caracterizan por ser órganos pares con forma de saco, que se ubican en la región abdominal fijados en la parte dorsal del mesenterio. En este sentido, esta especie según Zanuy y Carrillo (1987) y Takashima y Hibiya, (1995), se incluye en el grupo de las especies denominadas como gonocóricas, donde las dos ramas del ovario, se encuentran unidas por el extremo posterior y forman el falso gonoducto, el cual junto con el conducto urinario forman el poro genital.

Los resultados del desarrollo ovárico en esta especie, hasta el momento han demuestran, que la clasificación del grado de maduración ovárica empleada, no solo identifica y distingue plenamente los distintos grados de desarrollo sexual en el pez blanco, apoyados por su IG respectivo, también demostraron que existió una correspondencia con el desarrollo histológico presentado en cada una de sus gónadas. Una primera evaluación, basada en imágenes de los cortes histológicos transversales de la sección media del ovario, perteneciente a cada una de las cuatro fases de maduración propuestas, mostraron por un lado, que en las secciones anteriores, media y posterior del mismo ovario, no se aprecian diferencias en cuanto a su estructura y composición. Lo anterior, indica que los folículos maduran en todo el ovario, no importando la sección de que se trate, y cuando los folículos maduros son ovulados, se desplazan a través del ovocele o lumen ovárico, hacia la parte posterior y son conducidos vía el falso oviducto

Discusión

hacia el poro genital, donde saldrán al momento de la ovodepositación. Lo anterior, incluye a los Aterinópsidos dentro de la clasificación de cist-ováricos, aclarando que no cuentan con un oviducto verdadero.

Un número reciente de revisiones, donde se aborda la descripción de las gónadas de los peces Teleósteos (Nagahama, 1983; Guraya, 1986; Dodd, 1986; Wallace y Selman, 1990; Grier, 1993 y 2000), reportan la participación de dos tipos de células: las sexuales y las somáticas, que conforman los ovarios de los peces. Las observaciones realizadas sobre las imágenes histológicas del ovario (Figuras 19,20), confirman la similitud con otros peces Teleósteos, puesto que se observó la presencia de un grupo de células y tejidos que componen la pared ovárica. Garibay-García (1993), mencionan la presencia de un tejido conjuntivo y de músculo liso como principales elementos estructurales de la cápsula ovárica, además mencionan que la capa externa del ovario, es la túnica albugínea y esta constituida por melanocitos, fibras de colágeno, fibroblastos y vasos sanguíneos.

Hoar (1969), describió a los ovarios de algunos peces Teleósteos como de tipo cist-ovárico, referido a la presencia de numerosas bolsas o laminillas ovígeras, también, denominadas lamelas. En el pez blanco, al igual que otros Teleósteos, las células germinales penetran al interior del ovario y forman las lamelas o sacos ovígeros. Particularmente, las imágenes histológicas demuestran la presencia de estas bolsas, donde van madurando los folículos, embebidos en el estroma. El término estroma es utilizado en mamíferos, y aplicado para peces (Nagahama, 1983) y éste, es empleado para describir el contenido de las lamelas ovígeras, que está representado por todos los tejidos y células que no son parte, o no son derivados del epitelio germinal ovárico. En tal caso, los folículos que si se derivan del epitelio germinal no son parte del estroma (Grier, 2000).

El constante reclutamiento de los folículos primarios, indicó la presencia de los llamados "bancos de ovogonias" durante todo el periodo de vida sexual, característica propia de los peces Teleósteos y de algunos anfibios (Tokarz, 1978). En la mayoría de los grupos de vertebrados, en las primeras fases de desarrollo embrionario o larval, el número de ovogonias se encuentra determinado. Lo anterior ocurre, desde el momento de los primeros procesos de desarrollo, cuando un grupo de células, denominadas células

Discusión

germinales primordiales, son producidas y migran a los tejidos no diferenciados, conocidos como primordios gonadales (Hardisty, 1979). Estas células, colonizan el área donde se desarrollaran las gónadas y se asocian con células somáticas, para constituir más adelante los ovarios. Por lo general, la colonización va seguida de la proliferación de células, dando como resultado un grupo de ovogonias. En muchos animales, todas o la mayoría de las ovogonias degeneran o entran en meiosis y son conservadas por el ovario para el momento que la hembra entra en actividad sexual. En muchos peces y anfibios, sin embargo, las ovogonias persisten dividiéndose por mitosis y entrando algunas a la meiosis, por todo el periodo de vida sexual (Peters, 1978; Tokarz, 1978).

En este estudio, los desoves constantes indican la presencia de hembras con distinta composición folicular a lo largo de la temporada reproductiva, en virtud de que al ser liberados los ovocitos maduros, otros folículos continúan con el proceso de ovogénesis. De acuerdo con los datos histológicos y el patrón de desoves y con base al criterio propuesto por Pankhurst (1998), se reitera que esta especie debe ser considerada como sincrónica por grupos con desoves múltiples.

Existen escasos trabajos donde se aborda la histología ovárica del pez blanco, como los Garibay-García (1993); Gonzáles-Barájas (2002); Moncayo y colaboradores (2003) y el realizado por Cárdenas (2003). Lo reportes coinciden, al describir entre cinco y siete estadios de desarrollo y crecimiento folicular. Las imágenes histológicas de los ovarios de *C. humboldtianum*, en el presente estudio, coinciden plenamente con estos cinco estadios. Sin embargo, no existe un consenso al nombrar dichos estadios, y es común emplear la clasificación descrita en forma general para los Teleósteos desarrollada por Selman y Wallace (1989), quienes mencionan las fases siguientes: previtelogenica, ovocito perinuclear, vesículas vitelinas, vitelogénesis temprana, intermedia y completa, inicio de la migración de la vesícula nuclear y fase de maduración.

Frecuentemente, se genera confusión al emplear diferente terminología para nombrar a las células sexuales y al folículo. La estructura anatómica funcional básica de los ovarios es el folículo, el cual está compuesto de células foliculares, una capa acelular y un ovocito. El ovocito correctamente concebido, es la célula sexual y es la parte medular del folículo (Takashima y Hibiya, 1995). Generalmente, se confunden estas dos

Discusión

estructuras, en tal caso, al describir el proceso de la ovogénesis se debe referir al folículo. Con base en lo anterior, en el presente trabajo, se planteó una clasificación empleando de forma correcta la palabra folículo para describir el proceso de la ovogénesis y equipararlos a los empleados en las clasificaciones ya descritas. Grier (2000), por su parte al demostrar que desde que se inicia la ovogénesis en el epitelio germinal, los ovocitos se recubren de células pre-foliculares fundamenta la terminología empleada en ésta investigación, lo cual será un aporte de este trabajo.

Es importante destacar algunos aspectos particulares de la histología del pez blanco, observados en esta investigación. En principio la naturaleza de los folículos primarios y secundarios fue de tipo basófila (reacción a la Hematoxilina-Eosina); los alvéolos corticales, son característicos en el citoplasma del ovocito sobre todo en los folículos terciarios, los cuales contienen glicoproteínas, que son liberadas al espacio perivitelino durante la fertilización, y los folículos, inician su desarrollo asociados a un epitelio luminal, apenas observable con la microscopia de luz óptica.

Otras características que son comunes con otros peces Teleósteos, son la presencia de dos capas de células foliculares. En tal caso, se logran apreciar una capa de células foliculares, una sola capa interna homogénea de células de la granulosa y una o dos capas exteriores heterogéneas de células de la teca y las capas de la teca y la granulosa están separadas por una membrana. El origen de las células foliculares, ha sido asociado al mesénquima (Braekvelt y McMillan, 1967), o bien a un origen epitelial (Bullough, 1942; Moser, 1967). En cambio, la literatura sugiere, que los ovocitos, son derivados de un epitelio luminal (Bullough, 1942, Lehari, 1968). Wallace y Selman (1990), concluyen que para los peces Teleósteos, el origen tanto de los ovocitos como de las células de la granulosa, se debe a un epitelio compactado del ovario, en tanto que las células de la teca al mesénquima. Entre la superficie del ovocito del pez blanco y la capa de las células de la granulosa hay una capa acelular denominada zona radiada (ZR). Conforme a lo que indicaron Takashi y Hibiya, (1995), en esta zona radiada o corión, se encuentran micro "vellosidades" que se originan del ovocito y de las células de la granulosa, y que penetran en la zona radiada y son nombrados como canales de unión; además, se han identificado en los folículos de los peces, áreas citoplasmáticas

Discusión

conectadas entre las células de la granulosa y el ovocito, solo observables con microscopía electrónica (Wallace y Selman, 1990).

Una observación importante en la histología ovárica de estos peces, es la aparición de estructuras de fibroproteínas, que se forman en la parte exterior de la pared folicular, junto a las células de la teca, cuando el folículo se encuentra en estado de vitelogénesis; éstas estructuras son denominadas filamentos adherentes (Figueroa, 1999) (Figura 20) y son determinantes para que el huevo se adhiera a algún tipo de sustrato, en su medio natural. La observación de las preparaciones, destacó que estas estructuras adherentes aparecen desde el estado de vitelogénesis primaria. Esta estructura ya fue descrita a nivel histológico anteriormente por Moncayo *et al.* (2003) para esta especie y por Figueroa (2006) para *Chirostoma riojai*, quienes sugieren que puede ser un criterio importante en la identificación taxonómica de las distintas especies de Aterinópsidos. Los filamentos envuelven al ovocito, Garibay-García (1993) menciona que los filamentos nacen en el extremo opuesto a la ubicación del micrópilo. Estas estructuras, se encuentran en la zona de las células foliculares, y se pueden describir como inclusiones acidófilas entre las células foliculares, en este caso dichas inclusiones se identificaron en los cortes transversales de los filamentos.

En esta especie, los gránulos de vitelo protéico se observan a partir del estado de folículo terciario, dichos gránulos se fusionan y forman una vacuola uniforme, característica en el citoplasma del ovocito de los folículos vitelinos, lo anterior coincidió con lo mostrado por Garibay-García (1993). Una característica importante en esta especie es que el corión, que se va engrosando conforme el folículo se desarrolla y no sufre un adelgazamiento, lo que es común en muchos Teleósteos, tal como lo describió Takashi y Hibiya (1995).

La ovogénesis en peces, también abarca los procesos tempranos de crecimiento, caracterizado por un arresto meiótico, sinopsis, duplicación de DNA ribosomal y foliculogénesis (Wallace y Selman, 1990), seguidos de la reactivación de la división, meiótica y el segundo arresto de la meiosis. El primer arresto miótico, ocurre en la profase I y el ovocito se desprende del mismo durante esta etapa de maduración, para que posteriormente en la metafase II, caiga en el segundo arresto miótico (Figura 25). El

Discusión

ovocito maduro u óvulo, es aquel que está listo para ser fertilizado. Sale del segundo arresto miótico y finaliza la segunda división de la meiosis con el estímulo de la fertilización (Evans, 1995; Takashi y Hibiya 1995).

Para *C. humboldtianum*, los folículos pre-vitelinos iniciaron su crecimiento a partir de las 12 a las 29 micras, lo que corresponde a los folículos primarios, secundarios y terciarios, respectivamente (Tabla 9 y Figura 22). El mayor crecimiento se da en el estado vitelino y maduro, cuando alcanzaron valores promedio de 288 y 598 micras, respectivamente. En el momento de la ovulación y como consecuencia de la hidratación, los óvulos llegan a medir hasta 1.01 cm de diámetro.

Como ya se mencionó, la descripción del proceso de desarrollo de la ovogénesis, ha sido descrito por varios investigadores, por lo tanto, la clasificación comúnmente empleada para los peces Teleósteos, se basa en la descripción y reconocimiento de varias fases como la de crecimiento, cromatina nuclear, cromatina perinuclear, fase de alveólo cortical, vitelogenénesis, fase de maduración y finalmente la ovulación. En éste estudio los términos que se aplicaron fueron: folículo primario, folículo secundario, folículo terciario, folículo vitelino y folículo maduro, respectivamente.

Por otro lado, en la fase de descanso reproductivo, las hembras presentaron poblaciones foliculares similares a las hembras con EMO I, II y III. Al respecto, es importante corroborar la aseveración hecha por algunos investigadores como Moncayo y colaboradores (2003), quienes notaron la presencia de ovocitos atrésicos en hembras de organismos silvestres. Por su parte, González-Barajas (2002), encontró hembras de esta especie, con ovarios en recrudescencia y consecuentemente en estado atrésico. Sin embargo, es importante centrar la atención en este aspecto, para lograr explicar el proceso anatómico-fisiológico y funcional y responder a la siguiente la pregunta ¿qué sucede con aquellos folículos vitelinos que se prestaban a madurar para ser ovulados, al no registrarse desoves posteriores?

Las hembras de *C. humboldtianum*, mostraron folículos pre-vitelinos y vitelinos durante los diferentes estadios de desarrollo ovárico. Lo anterior, explica la estrategia reproductiva de la especie, y coincide con otros datos histológicos (Cárdenas, 2003;

Discusión

Moncayo *et al.*, 2003). No obstante, a diferencia de otros estudios, la clasificación de los estadios de maduración gonadal propuesta en esta investigación, se encuentra respaldada por las observaciones histológicas que muestran el proceso gradual de la primera madurez gonadal. Los desoves constantes, indican la presencia de hembras con distinta composición folicular a lo largo de la temporada reproductiva, en virtud de que al ser liberados los ovocitos maduros, otros folículos continúan con el proceso de ovogénesis, que es característico de los desovadores de tipo sincrónico por grupos con desoves múltiples (Solórzano, 1961).

En la época de recuperación sexual, las hembras mostraron gónadas pos-desove o recrudescientes (Estadio V), que permanecieron en el mismo estadio de desarrollo que tenían cuando terminó la temporada reproductiva. Estas observaciones, pudieran indicar que los ovarios detuvieron su proceso de ovogénesis, conservaron su población folicular y muy probablemente su capacidad esteroidogénica. Lo anterior, está basado en los recientes hallazgos, en las que se mostró que esta especie detiene su actividad reproductiva cuando las condiciones ambientales de fotoperiodo y temperatura del agua, son igualadas artificialmente a la época de descanso reproductivo y reanudaron sus ovodepositaciones cuando las condiciones ambientales nuevamente se tornaron favorables (Blancas *et al.*, 2004).

La agrupación de los ovarios, conforme a su fase de maduración propuesta en la escala empírica, reflejó el desarrollo interno del ovario, en virtud de apreciarse una diferencia significativa en la composición, en cuanto a las frecuencias de los folículos en todos los estados de maduración que representan cada fase. Al respecto, se destacó la ausencia de folículos maduros en el estado I de desarrollo ovárico, lo cual correspondió a la clasificación de hembras vírgenes y jóvenes; mientras que, conforme avanzó la fase de maduración (II, III y IV), la presencia de folículos maduros se hizo importante.

Finalmente, la descripción hecha en esta investigación, aclaró el hecho de que en otros trabajos (González-Barajas, 2002; Cárdenas, 2003; Moncayo *et al.*, 2003), se menciona una incongruencia entre las descripciones macroscópicas y las histológicas, al mencionar que los ovarios con desarrollo incipiente contenían folículos en estados avanzados de desarrollo. El seguimiento de la primera maduración y de la primera época

Discusión

de recrudescencia, aclaró que las hembras desovadas, conservan cierta población de sus folículos avanzados, sosteniendo una posible actividad esteroideogénica o viceversa; la producción de hormonas posiblemente sostuvo a la población folicular.

Niveles circulantes de las hormonas: 17β - estradiol ($17\beta E_2$) y la 17α , -hidroxiprogesteroona ($17-P_4$).

Las concentraciones de ambas hormonas circulantes coinciden con la bibliografía especializada en peces Teleósteos (Aida, 1988; Little *et al.*, 2000; Mylonas y Zohar, 2001). Durante todo el estudio, y dependiendo de la época que se trate y el EMO al que pertenecen las hembras, se registraron concentraciones de estas hormonas.

En la figura 27 a y b, se destacan las fluctuaciones que presentaron los niveles hormonales analizados en ambas temporadas y se muestra una misma tendencia, partiendo de niveles significativos en hembras con un EMO I (Estadio inmaduro), los que disminuyen cuando continúan su madurez y alcanzan el EMO II (Estadio de madurez temprana), para posteriormente, incrementar sus niveles cuando llegan al EMO III (Estadio de crecimiento ovárico), y alcanzar los niveles máximos en el EMO IV (Estadio en desove), lo anterior en la temporada de desoves. Mientras que en la época de descanso reproductivo, se observó esta misma tendencia en las hembras pos-desove y se les agrupó conforme al desarrollo de sus ovarios (equiparables a los EMO I, II y III de la época de desoves). Las características de las poblaciones foliculares de las hembras dependiendo de su EMO en la época de reproducción, correspondió a la población de hembras con su correspondiente EMO en época de recuperación sexual. Lo anterior sugirió, que esta población folicular mantuvo los niveles de metabolismo hormonal.

En esta especie, se encontraron niveles altos de E_2 y $17-P_4$ en etapas tempranas, donde los ovarios presentan en su primera maduración una dominancia de folículos pre-vitelogenéticos (folículos primarios, secundarios y terciarios). Esto resulta interesante, ya que sugiere una actividad esteroideogénica temprana de los ovocitos. La limitación de haber empleado microscopía de luz, no permitió observar con detalle las capas foliculares desarrolladas que rodean a los ovocitos. Con mucha afinidad a los otros grupos de vertebrados, y basados en varios estudios *in vitro* sobre todo en Salmónidos, se ha

Discusión

establecido un modelo de dos células foliculares, que involucran dos capas foliculares, la formada por las células de la teca y la constituida por las células de la granulosa (Young *et al.*, 1983). En este modelo, las células de la teca producen la 17α -hidróxi progesterona, (17-P_4), la cual atraviesa la lámina basal y es convertida en $17\alpha,20\beta$, -dihidróxi-progesterona ($17\alpha,20\beta\text{-DP}_4$) por las células de la granulosa, donde la GTH-I, actúa para inducir la síntesis *de novo* de la 20β -hidroxi-esteroide-deshidrogenasa ($20\beta\text{-HSD}$), enzima involucrada en convertir la 17-P_4 en $17\alpha,20\beta\text{-DP}_4$ (Nagahama, 1997).

Lo anterior, se relacionó con lo descrito por Grier (2000), quien reporta la formación de capas pre-foliculares en los primeros estadios de desarrollo de los ovocitos en peces, y por lo tanto, la posible actividad de formación sobre todo del estradiol. Sin embargo, resulta de necesario efectuar en lo futuro evaluaciones de otras hormonas, como las gonadotropinas (GtH I y GtH II), para verificar la procedencia de los significativos niveles hormonales en hembras inmaduras.

La presencia de 17-P_4 , en las fases tempranas, sugiere su participación como sustrato biológico, para continuar con la ruta metabólica hacia la aromatización, y no hacia la formación del precursor de la Sustancia Inductora de la Maduración (MIS), denominado así por Nagahama (1997). Por otro lado, la permanencia de estos niveles hormonales séricos, en la época de descanso reproductivo, se podría relacionar según estas observaciones, principalmente con el hecho de que, los ovarios conservaron la población folicular que tenían cuando terminó la temporada reproductiva. Otra explicación, podría consistir en que como lo menciona Lee y Yang, (2001), las células foliculares de la teca y granulosa, después de la ovulación conservan su actividad, aún sin la presencia de su respectivo ovocito.

Los niveles hormonales de E_2 y de la 17-P_4 encontrados en *C. humboldtianum*, apoyaron lo anterior. Al comparar a las hembras con estados similares de desarrollo ovárico, entre la época de desoves y la de descanso reproductivo, se encontró, al igual que con la composición folicular, que los niveles hormonales fueron similares para ambas temporadas (ANDEVA $P < 0.05$), lo que sugiere que en la temporada de no desoves, los ovarios mantienen su capacidad esteroideogénica, la cual fue sostenida por su población folicular. Sin embargo, las hembras no alcanzaron su máximo estado de madurez, debido

probablemente al gran gasto metabólico que les infringió la temporada reproductiva. Una tesis interesante inspirada en el trabajo de Blancas *et al.* (2004), es el hecho que las hembras de esta especie, por su alto potencial reproductivo, mantienen su población folicular, esperando un incremento en la temperatura, como estímulo para reanudar su actividad de desove. Por lo tanto, el seguimiento de los niveles hormonales desde etapas juveniles hasta el final de su vida reproductiva, pudiera ser un campo de investigación muy interesante en futuros estudios.

Los niveles hormonales encontrados en este estudio indicaron una actividad esteroidogénica temprana (EMO I), lo cual difiere de otros hallazgos, en los cuales se sostiene que la máxima capacidad esteroidogénica se debe a las capas foliculares bien desarrolladas propias de folículos vitelinos y maduros, que caracterizan a las gónadas maduras (Fostier *et al.*, 1983; Nagahama, 1987 y 1997; Devlin y Nagahama, 2002; Lee y Yang, 2001).

Diversas evidencias en el campo de la endocrinología en peces, enfatizan el papel que desempeña las células de la teca en la síntesis de la 17-P₄, y la subsiguiente participación de las células de la granulosa para transformarla en la 17,20β-P₄, y en la 17,20β, 21-P₄; mientras que por otra vía metabólica, en las células de la granulosa es transformada la 17-P₄ a E₂ vía la testosterona (Fostier *et al.*, 1983; Devlin y Nagahama, 2002; Lee y Yang, 2001). En este estudio, la población folicular para las hembras en el estadio I, estuvo caracterizada por la ausencia de folículos vitelinos y maduros y sólo por la presencia de folículos primarios y secundarios, los cuales no mostraron un desarrollo completo de sus paredes foliculares; sin embargo, sí presentaron niveles hormonales significativos.

Los estudios de Nakamura y Nagahama (1993) realizados en Ciclidos y Salmónidos, coinciden con lo aquí reportado. Estos investigadores, sugirieron una actividad hormonal temprana como requisito necesario para iniciar el proceso de diferenciación gonadal y además, mostraron que las células productoras de esteroides aparecen inicialmente al mismo tiempo que ocurre la diferenciación gonadal como se da en la tilapia (*Oreochromis niloticus*) y en el salmón (*Oncorhynchus rhodurus*). Asimismo, con ayuda de procedimientos inmunohistoquímicos, ha sido evidente la actividad

Discusión

aromatizante en células productoras de esteroides en ovarios inmaduros de *Oreochromis niloticus* (Kobayashi *et al.*, 1996).

Schulz *et al.* (1993) mencionan, que antes de que los esteroides sexuales presenten variaciones cíclicas a lo largo de la vida reproductiva, los esteroides juegan igualmente un papel esencial durante la diferenciación y el desarrollo temprano de las gónadas. Lo que pone de manifiesto nuevamente, una explicación de la actividad esteroidogénica en los ovarios. Grier (2000), encontró que desde el inicio de la ovogénesis, las ovogonias que están aún en el epitelio germinal, ya se encuentran rodeadas de células pre-foliculares visibles sólo por microscopía electrónica. Estas evidencias pudieran explicar los niveles de hormonas encontrados en las gónadas inmaduras en la presente investigación, y apoya la tesis, de una temprana actividad aromatizante en las incipientes estructuras foliculares. Recientemente, para una especie Neotropical mexicana (*Petenia splendida*) Pérez (2006), reportó la presencia de niveles significativos de estradiol en hembras en cuyos ovarios también se presentan principalmente folículos pre-vitelinos. Por otro lado, también existen evidencias en la producción o conversión extragonadal de hormonas esteroides en células del cerebro, lo cual implica un importante papel en el control de desarrollo gonadal (Callard *et al.*, 1982), situación que sugiere una interrogante posterior al proceso de diferenciación sexual ¿en qué momento se inicia la síntesis de los esteroides gonadales en los peces blancos?

Se abre un campo muy interesante con esta interrogante, atendiendo que se debe monitorear escrupulosamente que sucede con el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas, y responder como se encuentran los niveles de las gonadotropinas principalmente. Otro aspecto sería el comprobar que efectivamente estas gónadas incipientes tienen actividad aromatizante, empleando herramientas como la inmunohistoquímica.

Por ejemplo, la disminución de los niveles hormonales circulantes observada en hembras con ovarios en el estadio II, en los cuales se apreciaron algunos ovocitos vitelinos y maduros, indican la posible influencia reguladora que tienen los niveles hormonales circulantes a nivel del hipotálamo y de la hipófisis, los cuales posiblemente inhibieron la liberación de GnRH y de las Gonadotropinas, y por lo tanto, su consecuente acción a nivel gonadal. Una posible explicación del ¿por qué continúa el proceso de

maduración ovárica y de la ovogénesis, con un decremento de niveles hormonales sexuales en este estadio?; es la que dan: Van Oordt y Goos (1987) al mencionar que bajas concentraciones de hormonas esteroides sexuales en la sangre, son suficientes para la mantener la producción de ovocitos vitelogénicos, pero no para la ovulación y maduración espontánea. Este control endocrino, coincide con los resultados obtenidos en este estudio para el pez blanco.

Aída (1988), encontró en tres especies de carpas, que los niveles circulantes de 17β -estradiol (E_2), disminuyen en la etapa final de la vitelogénesis, provocado por un pico de la GtH I, cuando se avecina el evento de la ovulación y del desove. Los altos niveles de E_2 circulantes en las hembras, en las fases de madurez ovárica IV, correspondiente a la alta incidencia de folículos en estado vitelogénico tardío, pudiera sugerir una retroalimentación negativa entre este esteroide sexual en el plasma y la GtH II, que como lo evidenciaron Nagahama (1997) y Mylonas y Zohar (2001) está involucrada en el evento del desove.

El proceso de la maduración del ovocito, ocurre antes de la ovulación y es un prerrequisito para una exitosa fertilización. Consiste en la desaparición de la vesícula germinal (fusión con la membrana del ovocito en el polo animal), la condensación del cromosoma, y la liberación del primer cuerpo polar (Nagahama, 1997). Actualmente, está establecido que la maduración en peces está regulado por tres grandes mediadores: la gonadotropina (GtH II), la hormona inductora de la maduración (HIM) y el factor promotor de la maduración (MPF), que funcionan a nivel de las células foliculares, la superficie del ovocito y el citoplasma del ovocito. En tal caso, las investigaciones realizadas en Salmónidos, sugieren que la acción maduradora del HIM, se sirve de mediadores que se encuentran en el citoplasma del ovocito. Lo anterior, desencadena una alta actividad que ocurre en la primera y segunda metafase de la meiosis, similar a lo que ocurre en vertebrados e invertebrados (Nagahama, 1997).

Se ha establecido sobre todo en Salmónidos, que la hormona inductora de la maduración (HIM) es la $17\alpha,20\beta$ -DP₄ (Nagahama y Adachi, 1985), y se reportaron niveles bajos en hembras en estado vitelogenético, que se incrementan en hembras maduras y en el momento de la ovulación. Al respecto, sería importante en un futuro considerar el

Discusión

perfil hormonal de estos peces, e incluir a otros esteroides sexuales y a la gonadotropinas, para conocer el proceso endocrino completo y no únicamente abocarse a las dos hormonas analizadas en la presente investigación.

Actualmente, se ha ido incrementando la cantidad de estudios que abordan y describen los perfiles hormonales sexuales, y los relacionan con el desarrollo gonádico y los procesos de inducción al desove y estimulación de la espermiación. Dentro de ellos destacan el realizado por Mylonas y Zohar (2001), quienes concluyen, una marcada participación del estradiol en las primeras etapas de la ovogénesis y donde también, se destaca la participación de la progesterona y particularmente de la $17\alpha,20\beta$ -DP₄, en las últimas etapas de la ovogénesis cercanas a la ovulación.

Finalmente, en la época de recrudescencia, las hembras al conservar su población, establecieron la conservación aparentemente de su capacidad esteroidogénica, respaldada por sus niveles hormonales o viceversa. Los niveles hormonales podrían ser mantenidos gracias a las poblaciones foliculares que los ovarios aún conservan, esperando probablemente un estímulo externo o señal interna para reanudar con la gametogénesis y ovulación. Esta investigación, ofrece además, una temática controversial, al informar actividad esteroidogénica temprana post-diferenciación y sobre todo la conservación de poblaciones foliculares en épocas post-desove.

CONCLUSIONES

- Como estrategia reproductiva en esta especie, para asegurar la fecundación de los huevos; las hembras tienen su primera maduración sexual a mayores edades que los machos (12 meses) y presentan un ritmo de crecimiento mayor. Mientras que los machos maduran tres meses antes.

- La sincronización en el inicio de la época reproductiva entre los peces nacidos en cautiverio con las poblaciones silvestres, demostró la presencia del ritmo biológico endógeno en estos peces, el cual fue estimulado por los cambios ambientales propios del inicio de la primavera. Esta actividad reproductiva implica una sola época de ovodepositaciones al año, sostenida por las hembras de mayor tamaño, debido a su capacidad endocrina; las pausas en los desoves obedecieron al gran desgaste metabólico, los desoves ocurridos en este lapso, fueron de las hembras más jóvenes para sostener la amplia época reproductiva.

- El patrón reproductivo del pez blanco debe ser considerado como sincrónico por grupos con desoves múltiples; y por su intensa y constante actividad de ovodepositaciones, los IG y IH solo serán un buen indicador de madurez gonádica únicamente para la época reproductiva, por expresar el proceso vitelogénico primordialmente. Particularmente el IH no tuvo correspondencia con el EMO y por lo tanto no se cumple con este apartado de la hipótesis planteada.

- Cuatro Estados de Madurez Ovário (EMO), agrupan a las hembras, durante la primera maduración y una más en la época de descanso. Fundamentados en sus IG y PEV, se establece su respectiva clasificación empírica de madurez gonádica, identificando los siguientes estados: a) Inmaduro (I), b) Madurez Temprana (II), c) Crecimiento Ovário (III) y d) Desove (IV) y Post-desove (V). Se aclara que la pigmentación oscura de los ovarios se adquiere en la primera maduración y se conserva definitivamente.

Conclusiones

- El patrón de desarrollo macroscópico, coincidió con el arreglo histológico dentro del ovárico y en conjunto clasifican al pez blanco, como especie: gonocórica, cistovárica, e iterópara.

- Durante el proceso de la ovogénesis, en todo momento existió, la presencia de ovogónias que entran al proceso de división meiótica, ocasionando el reclutamiento constante de folículos primarios. El desarrollo folicular inicia en el epitelio germinal y continúa en el estroma, dentro de las lamelas o sacos ovíferos. Se deben denominar cada EDF como: folículos primarios, secundarios, terciarios, vitelinos y maduros. Los folículos presentaron inicialmente citoplasma basófilo, después se tornaron acidófilos y por último se vacuolizan.

- Como características distintivas en la ovogénesis en estos peces, la zona radiada, se observan como inclusiones acidófilas y estriadas, las cuales se desarrollaron al inicio de la fase vitelina. Fibroproteínas, forman las estructuras adherentes características de los huevos en este género, las cuales se aparecen en la parte exterior de la pared folicular, cuando el folículo se encontró en estado de vitelogénesis temprana.

- Las dimensiones de los ovarios, sus poblaciones foliculares y sus niveles hormonales fueron similares en ambas épocas entre las hembras con desarrollo gonádico similar.

- En la época de descanso reproductivo, y también como característica propia de su estrategia reproductiva, los ovarios detuvieron su proceso de ovogénesis, conservando su población folicular y su capacidad esteroidogénica. Los niveles séricos del E_2 y la $17-P_4$, se mantuvieron apoyados en el sustrato biológico, que les representa su población folicular la cual también se conservó.

- Se presentó una gran actividad esteroidogénica en etapas tempranas de maduración gonádica, lo anterior sugirió, la posible participación de células pre-foliculares. Pero no se descarta la producción hormonal extragonadales, por lo que se recomienda evaluar otros niveles hormonales dentro de ellos las gonadotropinas (GtH I y GtH II) y corroborar la actividad aromatizante de los folículos en desarrollo.

Conclusiones

- Se sugiere que la presencia de la 17-P₄, en hembras inmaduras, tuvo una implicación principalmente como sustrato biológico, en la formación del E₂, y no como precursor del esteroide responsable de la maduración y la ovulación; mientras que en las hembras maduras, la ruta metabólica fue hacia la formación de esta HIM.

- La hipótesis segunda fase de la hipótesis planteada en la presente investigación, no se cumple, en virtud de que el desarrollo gonádico, no estuvo caracterizado por los niveles circulantes de estos esteroides sexuales y si bien la participación del E₂ fue significativa en las fases vitelinas, también lo fue y en forma significativa en las fases de desove, mientras que los altos valores de 17-P₄ acompañó los eventos finales de maduración pero no necesariamente con la presencia de altas frecuencias de folículos maduros.

LITERATURA CITADA

- *Aida, K. 1988. A review of plasma hormone changes during ovulation in cyprinid fishes. *Aquaculture* 74: 11-21.
- *Aguilar, J. F. y Navarrete, N. 1996. Crecimiento, condición y mortalidad del charal *Chirostoma humboldtianum* (Atheriniformes: Atherinidae) en México. *Rev. Biol. Trop.* 45(1): 573-578.
- *Aguilar-Ponce, J. F. 1993. Crecimiento, supervivencia y reproducción del charal *Chirostoma humboldtianum* en el embalse San Felipe Tiacaque, Edo. de México. Tesis de Licenciatura Biólogo, Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM, México. 37p.
- *Alaye, R. N. 1993. Hemoglobina de Aterinidos de aguas dulces: género *Chirostoma* spp. del lago de Pátzcuaro Michoacán, México. I.N.P. SEMARNAP. *Ciencia Pesquera* 10: 97-109.
- *Alaye, R. N. 1996. Estudios del polimorfismo de la hemoglobina para identificar especies del género *Chirostoma* del Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. INP. SEMARNAP. *Ciencia Pesquera* 13: 1-9.
- *Álvarez del Villar, J. y Navarro, L. 1957. *Los peces del Valle de México*. Secretaria de Marina, Instituto Nacional de Pesca e Industrias Conexas. México. Pp. 3-22.
- *Arredondo, F. J., Campos, V. R y Hernández U. S. 1993. *Desarrollo científico y tecnológico del cultivo de corvina*. Secretaria de Pesca, Coordinación del Programa de Acuacultura y Pesca, Instituto Mexicano de Investigaciones Tecnológicas, A. C. México, D. F. 120 p.
- *Arregui, F. 1979. Plan Piccolos Chapala. Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma de Guadalajara, México 102 p.
- *Barbour, C. D. 1973a. A biogeographical history of *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae), A. Species Flock from the Mexican Plateau. *Copeia* 3: 533-556.
- *Barbour, C. D. 1973b. The systematic and evolution of the genus *Chirostoma* Swaison. *Tulane Studies in Zoology and Botany* 18 (3): 97-141.
- *Barriga-Sosa, I de los A. 2002. Morphological and genetic variation in seven species of endangered *Chirostoma* "humboldtianum species group" (Atheriniformes: Atherinopsidae). *Rev. Biol. Trop.* 50(1): 199-216.
- *Barriga-Sosa, I de los A., Pérez Ramírez, M. Y., Soto-Aguirre, F., Castillo-Rivera, M. y Arredondo-Figueroa, J. L. 2005. Inter-specific variation of the mitochondrial r16S gene among silverside, "Peces Blancos", (Atherinopsidae: Menidiinae) and its utilization for species identification. *Aquaculture* 250: 637-651.
- *Baroiller, J. F., Guiguen, y Fostier, A. 1999. Endocrine and environment of sex differentiation in fish. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55: 910-931.
- *Bergland, I. 1995. Effects of spring temperature and feeding regime on sexual maturation in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) male parr. Swedish University of Agricultural Sciences, S-901 83 Umeå, Pp. 170-174.

Literatura Citada

- *Bhattacharya, S. y Banerje, P. P. 1988. Environmental and endocrine control of fish reproduction. *Impacts of Environment on Animals and Aquaculture* 85 – 90.
- *Blancas, A. G. 2002. Efecto de Ciclos Estacionales Artificialmente Comprimidos (Temperatura y Fotoperiodo), en el Desarrollo Gonádico del Pez Blanco (*Chirostoma humboldtianum* Valenciennes, 1835) (Pisces: Atherinopsidae). Tesis de Maestría en Biología de La Reproducción Animal. Universidad Autónoma Metropolitana -Iztapalapa. México. 85 p.
- *Blancas, A. G., Figueroa, F. L., Barriga, S. I. y Arredondo, F. J. L 2003. Primeras experiencias sobre el manejo de reproductores de Pez Blanco (*Chirostoma humboldtianum* Valenciennes, 1935) bajo condiciones controladas. II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. CIVA 2003. Universidad Zaragoza España. Pp. 30-42.
- *Blancas, A. G., Figueroa, F. L., Barriga, S. I. y Arredondo, F. J. L 2003a. Aportaciones al cultivo del Pez Blanco (Pisces: Atherinopsidae) En: Rojas, C. P. M. y Fuentes, C. D. (Compiladores). Historia y avances del cultivo de pescado blanco. Instituto Nacional de la Pesca. México D. F. (3) Pp.155-168.
- *Blancas, A. G., Figueroa, F. L., Barriga, S. I. y Arredondo, F. J. L. 2004. Effects of an artificial photothermal cycle on the reproduction of the shortfin silverside, *Chirostoma humboldtianum*, Valenciennes, 1835 (Pisces: Atherinopsidae). *Aquaculture* 241: 575-585.
- *Borg, B. 1994. Androgens in Teleost fishes. *Comparative Biochemical and Physiology* 109: 219-245.
- *Braekevelt, C. R. y McMillan, D. B. 1967. Cyclic changes in the ovary of the brook Stickleback. *Eucalia inconstans* (Kirtland). *J. Morphol.* 123: 373-396.
- *Bromage, N. R. y Cumaranatunga, P. R. T. 1988. Egg production in rainbow trout. In: Muir, J. F. y Roberts, R. J. (Eds.). Recent Advances in Aquaculture. London and Sydney: Croomm. Hehn, Pp. 56-138.
- *Bullough, W. W. 1942. Gametogenesis and some endocrine factors affecting it in the adult minnow (*Phoxinus phoxinus* L.). *J. Endocrinol.* 3: 211-219.
- *Callard GV, Manz L, Petro Z, Claiborne JB. 1982. Brain estrogens biosynthesis and estrogen conjugating system in the sculpin (*Myoxocephalus*). *Bull Mount Desert Island Biol Lab*; 22:41-43
- *Cárdenas, R. R. 2003. Cultivo de pez blanco *Chirostoma humboldtianum*. Consideraciones para su producción. En: Rojas, C. P. y Fuentes, C. D. 2003. Historia y Avances del cultivo de pescado blanco. Instituto Nacional de La Pesca. SAGARPA. México. Pp. 191-210.
- *Carolsfeld J, Scott AP, Collins PM, Sherwood NM. 1996. Reproductive steroids during maturation in a primitive Teleost, the Pacific Herring (*Clupea harengus pallasii*). *Gen Comp Endocrinol*; 103:331-348.
- *Carrillo, M. y Zanuy, S. 1993. Fisiología de la reproducción: Fisiología de la reproducción de los Teleósteos. In: Castellón O. F (Coord.). *Acuicultura marina; fundamentos biológicos y tecnología de la reproducción*. Universidad de Barcelona. Pp. 125-142.
- *Castro-Aguirre, J. J. y Espinosa, P. H. 2006. The fishes of the family atherinopsidae (Teleostei: Atheriniformes) from Mexican iso and hypersalin coastal lagoons. *Hidrobiológica* 16 (1): 89-101.

- *Chang, J. P. y Jobin, R. M. 1994. Regulation of gonadotropin release in vertebrates a comparison of GnRH mechanisms of action. In: Davey, K. G., Peter, R. E., Tabe, S. S. (Eds.). Perspectives in comparative endocrinology. Ottawa, Canada: National Research Council of Canada. Pp. 41-51.
- *Chigby, P. y Sibley, T. H. 1994. Relationship between abundance, growth eggs size and fecundity in a landlocked population of longfin smelt, *Spirinchus thaleichthys*. *J. Fish Biol* 45. 1-15.
- *Davies, P. B. y Bromage, N. 1995. The effects of photoperiod and temperature on serum GtH I y GtH II and the timing of Maturation in the female Rainbow Trout. Institute of Aquaculture, University of Stirling, Northwest Fisheries Science Centre. Seattle, WA, USA. 185 p.
- *Devlin, H. R. y Nagahama, Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208:191-364.
- *Dye, H. M., Sumpter, J. P., Fagerlund, U. H. M. and Donaldson, E. M. 1986. Changes in reproductive parameters during the spawning migration of pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha*. *Journal of Fish Biology* 29: 167-176.
- *Dyer, B. S. y Chernoff. 1996. Phylogenetic relationships among atheriniform fishes (Teleostei: Atherinomorpha). *Zool. J. Linnean Soc* 117: 1-69.
- *Estrada, F. E., Peralta, Z. L. y Rivas, M. P. 1982. *Manual de técnicas histológicas*. Editorial A.G.T. Mexico D. F. 140 p.
- *Evans, D. 1995. *The Physiology of Fishes*. CRC Press. University of Florida, USA. 135 p.
- *Falcón, J., Molina-Borja, M., Collin, J. P. y Caknin, S. 1996. Fish Physiology on Biochemistry. *Fish Physiol. Biochem.* 15(5): 401 – 411.
- *Figueroa Lucero, G. 2006. Historia de vida reproductiva del charal del Alto Lerma *Chirostoma riojai* Solórzano y López, 1965 (Atheriniformes: Atherinopsidae). Tesis Doctoral, Universidad Autónoma Metropolitana, 166 p.
- *Figueroa-Lucero, G., Hernández-Rubio, Ma. C., Ríos-Becerril G. y Sevilla-Hernández Ma. L. 1999. Bioensayos de alimentación en alevines de *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes) (Pisces: Atherinidae) bajo condiciones de laboratorio. *An. Esc. Nat. Cien. Biol.*: 45: 17-23.
- *Figueroa-Lucero, G., Paulo-Maya J., Hernández-Rubio, Ma. C. 2003. Retrospectiva y avances en el conocimiento de la biología y ecología de los charales y peces blancos del género *Chirostoma* (Atheriniformes: Atherinopsidae) en la ENCB-IPN. En: Rojas, C. P. M. y Fuentes, C. D. (Compiladores). Historia y avances del cultivo de pescado blanco. Nacional de la Pesca. México D. F. (1) 29-48.
- *Figueroa-Lucero, Meza, G. O., G., Hernández R. Ma. C., Barriga, S. I. de los A., y Arredondo, F. J. L. 2004. Growth, survival and mandible development in the larvae of the shortfin silverside *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes) (Atheriniformes: Atherinopsidae) under laboratory conditions. *Aquaculture* 242: 689-696.
- *Fitzpatrick, M. S., Redding, J. M., Ratti, F. D. and Chreck, C. B. 1987. Plasma testosterone concentration predicts the ovulatory response of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) to

Literatura Citada

- gonadotropin-releasing hormone analog. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 44. 1351. In: Evans, D. 1995. *The Physiology of Fishes*. University of Florida, CRC, USA. Pp.78-92.
- *Flores, R. L. 1985. Contribución al conocimiento de hembras de charal *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes) Pises: Atherinidae del embalse Huapango, Edo. de México. Tesis de licenciatura, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas I.P.N., México, 50 p.
- *Forniés, M. A., Mañanos, E., Carrillo, M., Rocha, A., Laureau, S., Mylonas, C. C., Zohar, Y. y Zanuy, S. 2001. Spawning induction of individual European sea bass females (*Dicentrarchus labrax*) using different GnRHa-delivery systems. *Aquaculture* 202: 221-234.
- *Fostier, A., Jalabert, B., Billard, R., Breton, B., and Zohar, Y. 1983. The gonadal steroids, In: A. Hoar, W. S. Randall, D. J. and Donaldson, E. M., (Eds.). *Fish Physiology* Vol. IX. Academic Press, Chap 7. New York.
- *García de León, F. J. 1984. Ecología pesquera alimentación y ciclo gonádico de *Chirostoma estor* Jordan y *Micropterus salmoides* Lecápea, en el lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. UANL. Monterrey México 178 p.
- *Garibay-García, R. 1993. Estudio histológico del testículo y ovario del charal *Chirostoma humboldtianum*, del embalse Huapango, Edo. Tesis de Licenciatura, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México, 46 p.
- *Grier, H. J. 1993. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: Russell, L. D., Griswold, M. D. (Eds.). *The Sertoli cell*. Clearwater, F. L. Cache River Press. Pp. 704-739.
- *Grier, Harry. 2000. Ovarian Germinal Epithelium and Folliculogenesis in the Common Snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). *Journal of Morphology* 243: 265-281.
- *Goos, H. J.Th., and five coauthors et al. 1987. The effect of luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LHRHa) in combination with different drugs with anti-dopamine and anti-serotonin properties on gonadotropin release and ovulation in the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture* 63:143-156.
- *Gothif, Y., Elizur, A., Zohar, Y, 1995. Three forms of gonadotropin-releasing hormone in githead seabream and striped bass: Physiological and molecular studies. In: Goetz, F. W., Thomas, P. (Eds.). *Reproductive Physiology of Fish*, Fish Symposium 95: Austin TX. Pp. 52-54.
- *González-Barajas, J. L. 2002. Descripción de la estructura y ultraestructura del ovario de *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes 1835). Tesis de licenciatura, FES Iztacala, UNAM, México 89 p.
- *Goodman-Gilman, A., Ruddan, R. W., Molinoff, P. B., Limbird, L. E. and Hardman, J. G. 1996. *Las bases farmacológicas de la terapia*. 9ª Edición. Vol. II Mc.Graw-Hill-Interamericana. México 1907 p.
- *Gorbman, A., 1983. Reproduction in cyclostome fishes and its regulation. In: A. Hoar, W. S. Randall, D. J. and Donaldson, E. M. (Eds.). *Fish Physiology*. Academic Press, Vol. IX (1). New York. Pp. 47-62.

Literatura Citada

- *Guraya, S. S. 1986. The cell and molecular biology of fish oogenesis. In: Karger, B. *Monograph in Developmental Biology*. Vol. 18, p. 223.
- *Haddy, J. A. y Pankhurst, N. W. 2000. The effects of salinity on reproductive development, plasma steroid levels, fertilization and egg survival in black bream *Acanthopagrus butcheri*. *Aquaculture* 188:115-131.
- *Hardisty, M. W. 1979. Primordial germ cells and the vertebrate germ line. In: R. E. Jones, (Ed.) *The Vertebrate Ovary*. Plenum Press. New York, Pp. 1-45.
- *Herrera, D. Ma. R., Luna, M. M. y Romero, R. C. 1993. Obtención de anticuerpos contra progesterona y estradiol, estandarización del radioinmunoanálisis y validación en suero de rumiantes. *Veterinaria Mexicana* 24(3):233-230.
- *Hoar, W. S. 1969. *Reproduction*. In *Fish Physiology*; Academic Press, New York, Vol. 3. Pp. 1-72.
- *Jiménez, B. M. L. y García, G. A. 1995. Evaluación de la pesquería multiespecífica de charales (*Chirostoma spp.*, Pisces: Atherinidae) del Lago de Pátzcuaro Michoacán, México. *Anales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Ser. Zool.* 66(2): 205-231.
- *Kagama, H., Young, G., Nagahama, Y., 1984. In vitro estradiol-17 beta and testosterone production by ovarian follicles of the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 54, 139-143.
- *Kah, O., Anglade, I., Leprêtre, E., Dupbourg, P. y de Monbrison, D. 1993. The reproductive brain in fish. *Fish Physiol. Biochem* 11: 85-98.
- *Kelly, M. Anita y Kohler, C. Christopher. 2000. Mammalian growth hormone-releasing hormone indirectly stimulates sex steroid production in Tilapia. *Journal of the World Aquaculture Society*: Vol. 31, No. 3: 416-425.
- *Kham, I. A. y Thomas, P. 1992. Stimulatory effects of serotonin on maturational gonadotropin release in the Atlantic croaker, *Micropogonias undulates*. *Gen. Comp. Endocrinology* 88: 389-396.
- *Kwon H. C. 1997. Effects of estradiol and pituitary hormones on *in vitro* vitellogenin synthesis in the eel, *Anguilla japonica*. *J Korean Fish Soc.* 30:282-290
- *Kobayashi, M., Aida, K., Hanya, U. 1996. Annual changes in plasma levels of gonadotropin and steroid hormones in the goldfish *Bull. Inst. Zool. Acad. Sin. Monogr.* 16, 139-172.
- *Lee, G. Luna (Editor). 1974. *Manual of histological staining methods of Armed Forces Institute of Pathology*. Third Edition. American Registry of Pathology. 87 p.
- *Lee, W. K. Y Yang, S. W. 2001. Relationship between ovarian development and serum levels of gonadal steroid hormones, and induction of oocyte maturation and ovulation in the cultured females Korean spotted sea bass *Lateolabrax maculatus* (Jeom-nong-eo). *Aquaculture* 207: 169-183.
- *Lehri, G. K. 1968. Cyclical changes in the ovary in the catfish *Clarias batrachus* (Linn.). *Acta Anat.* 69: 105-124.

Literatura Citada

- *Limón, J. G. M. y Lind, O. T. 1989. Long and short term variation in the physical and chemical limnology of a larger shallow. Turbid Tropical Lake (Lake Chapala México). *Archiv. Hydrobiol./Suppl.* 83(1):57-81.
- *Lin, E. R. y Peter, R. E. 1996. Hormones and spawning in fish. Department of Biology. Zhongshan University Guangzhou. China. *Asian Fisheries Science* 9(1): 21 – 33.
- *Little, D. C., Coward, K., Bhujel, R. C., Pham, T.A. y Bromage, N.R. 2000. Effect of broodfish exchange strategy on the spawning performance and sex steroids hormone levels of *Oreochromis niloticus* broodfish in hapas. *Aquaculture* 186: 77-88.
- *Mares B. G. y Morales P. J. J. 2003. Contribución al estudio de cultivo de pescado blanco *Chirostoma estor estor* en el Centro Regional de Investigación Pesquera de Pátzcuaro, Michoacán. En: Rojas C. P., Fuentes C. D. (Editores). *Historia y avances del cultivo de pescado blanco*. México D. F. Instituto Nacional de la Pesca. Pp. 43-154.
- *Martínez-Palacios. C. A., Barriga, T. E., Taylor, J. F., Ríos, D. G. y Ross, L. G. 2002. Effects of temperature on growth and survival of *Chirostoma estor estor*, Jordan 1879, monitored using a simple video technique for remote measurement of length and mass of larval and juvenile fishes. *Aquaculture* 209: 369-377.
- *Matsuyama, M., Adachi, S., Nagahama, Y., Kitajima, C. y Matsuura, S. 1991. Annual reproductive cycle of the captive female Japanese sardine *Sardinops melanostictus*: relationship to ovarian development and serum levels of gonadal steroid hormones. *Mar. Biol.* 108: 21-29.
- *Mendoza, S. L. R., Maldonado, V. y Medina, N. M. 1995. Aspectos reproductivos y alimentarios d *Chirostoma humboldtianum* de la Laguna de Zacapu, Michoacán. Resúmenes del XIII Congreso Nacional de Zoología, México. p 84.
- *Moncayo, L. M. E., Flores, R. y A. Téllez, P. 1983. Contribución al conocimiento de la Biología del charal *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes) del embalse Huapango, Edo. de México, 1981– 1982. Resúmenes del VII Congreso Nacional de Zoología, Xalapa, Veracruz, p. 121.
- *Moncayo, L. M. E., Uriá, G. E. y García, G. R. 2003. Madurez ovárica de *Chirostoma humboldtianum* del embalse Huapango Estado de México. Departamento de Zoología Escuela Nacional de Ciencias Biológicas – Instituto Politécnico Nacional, México. Memorias de la primera reunión Nacional de Atherinópsidos, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa (noviembre 2003), México. P 36.
- *Morehead, D. T., Ritar, A. J., y Pankhurst, N. W. 2000. Effects of consecutive 9 or 12 month photothermal cycles and handling on sex steroid levels, oocyte development, and reproductive performance in female striped trumpeter *Latris lineata* (Latrididae). *Aquaculture* 180: 293-305.
- *Moreno, L. M. A. 1993. Determinación de la edad y crecimiento y ciclo reproductivo de *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes), (Pisces: Atherinidae) en el embalse "Cuitzeo" Michoacán, México. IV Congreso Nacional de Ictiología. P 31.
- *Moser, H. G. 1967. Seasonal histological changes in the gonads of *Sebastodes paucispinis* Ayres, an ovoviparous teleost (family Scorpaenidae). *J. Morphol.* 123: 229-254.

Literatura Citada

- *Moyle, P. B. y Cech, J. J. 2000. *Fishes an Introduction to Ichthyology*. Department of Wildlife Fish, and Conservation Biology. University of California. Fourth Edition. Prentice Hall. New Jersey. 96 p.
- *Munro, A. D. 1990. General introduction. *In*: Munro, A. D., Scott, A. D. y Lam, T. J. (Eds.). *Reproductive seasonality in Teleosts environmental influences*. CRC. Press, Boca Raton Florida. Pp. 1-11.
- *Muñoz, C. J. A.. 2003. *Control hormonal de la reproducción en peces*. Revisión. Facultad de Ciencias del Mar y Ambientes. Universidad de Cádiz. España. 54 p.
- *Mylonas, C. C., Woods, C. L., Thomas, P. y Zohar, Y. 1998. Endocrine profiles of female Striped Bass (*Morone saxatilis*) in captivity, during postvitellogenesis and Induction of final oocyte maturation via controlled-release GnRH. *Delevry Systems. General and Comparative Endocrinology* 110: 276-289.
- *Mylonas, C. C y Zohar, Y. 2001. Endocrine regulation and artificial induction of oocyte maturation and spermiation in basses of the genus *Morone*. *Aquaculture* 202: 205-220.
- *Nagahama, Y. 1983. The functional morphological changes in the gonads. *In*: Hoar, H. S., Randall, D. I y Donaldson, E. M., (Eds.). *Reproduction – Endocrine Tissues and Hormones*. New York. Academic Press, Pp. 223-275.
- *Nagahama, Yoshitaka. 1987. Endocrine control of oocyte maturation. *In*: Norris, D. O. and Jones, R. E. (Eds.). *Hormones and reproduction in fishes, amphibians and reptiles*. Plenum. New York. Pp.171-201.
- *Nagahama, Y., Yoshikuni, M., Yamashita, M., Tokumoto, T. and Katsu, Y. 1995. Regulation of oocyte growth and maturation in Fish. *Current Topics in Developmental Biology*. 30: 103-145
- *Nagahama, Yoshitaka. 1997. $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one a maturation-inducing hormone in fish oocytes: Mechanisms of synthesis and action. *Steroids* 62: 190-196.
- *Nakamura M, y Nagahama Y. 1993. Ultrastructural study on the differentiation and development of steroid-producing cells during ovarian differentiation in the amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*. *Aquaculture* 112:237-251
- *Navarrete, S. N. A. 1994. *Temporada reproductiva y fecundidad de dos especies de charal C. jordani y C. humboldtianum del Estado d México*. Ejercicio Calificador, UNAM, México, 30 p.
- *Nikolsky, G. V. 1963. *The ecology of fish*. New York, Academic Press. 352 p.
- *Palacios-Saucedo, M. C. 1998. Ciclo ovárico y desarrollo embrionario del pez blanco de Zacapu *Chirostoma humboldtianum* Valenciennes 1835, (Pisces Atherinidae) en condiciones de cautiverio. Tesis de Licenciatura, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México. 82 p.
- *Oppen-Bersten, D. O., Gram-Jensen, E. and Walther, B. Th. 1991. Original of teleostean eggshell Zr-proteins and their significance during oogenesis: *in vitro* liver synthesis of egg shell proteins induced by estradiol- 17β . *In* Scott, A. P., Sumpter, J. P., Kime, D. E. and Rolfe, M. S. Eds. *Proc. Fourth Int. Symp. Reproductive Physiology of Fish*. Sheffield, UK: University of Sheffield Press, pp. 306-8.

- *Patiño, R. 1997. Manipulations of the Reproductive System of Fishes by Means of Exogenous Chemicals. *The Progressive Fish Culturist* 59:118-128.
- *Paulo-Maya, J. 2004. Evolución intragenérica: Ecomorfología alimentaria del género *Chirostoma* (Swainson). *Tesis doctoral*. ENCB-IPN. México, 108 p.
- *Paulo-Maya, J., Figueroa, L. G. y Soria, B. M. 2000. Peces dulceacuícolas mexicanos XIX *Chirostoma humboldtianum* (Atheriniformes: Atherinopsidae). *Zoología informa*. ENCB-IPN. (3): 59-74.
- *Pankhurst, N. W. 1998, Reproduction. In: Black, K. D. y Pickering A. D. (Eds.). *Biology of Farmed Fish*. Sheffield Academic Press. 1st ed. U. S. A. Pp.1-18.
- *Pankhurst, N. W. y Carragher, J. F. 1991. Seasonal endocrine cycles in marine Teleosts, In: Muñoz, C. J. A. 2003. *Control hormonal de la reproducción en peces*. Revisión. Facultad de Ciencias del Mar y Ambientes. Universidad de Cádiz. España. 54 p.
- *Pankhurst, N. W. y Conroy, A. M. 1988. Endocrine changes during gonadal maturation and spawning in the orange roughy (*Hoplostethus atlanticus* Colett), a teleost from the midslope waters off New Zealand. *Gen. Comp. Endocrinol.* 70: 262-273.
- *Peralta, C. L. 1991. Ciclo gonádico a nivel histológico en hembras de *Chirostoma estor* copandaro (Pescado blanco) en el lago de Pátzcuaro, Michoacán. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. UNAM. 116 p.
- *Pérez VMH. 2006. Estudio histológico y endocrino de los ciclidos Neotropicales, Tenguayaca, *Petenia splendida* y la Mojarra Pinta, *Parachromis (Cichlasoma) managuensis* del Sureste de México. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma Metropolitana. México D. F. 98 p
- *Peter, R. E., Yu, K. L., Marchant, T. A. and Roseblu, P. M. 1990. Direct neural regulation of the teleost adenohypophysis. *Journal of Experimental Zoology Supplement* 4: 84-89.
- *Peter, R. E., Trudeau, v. L., Soley, B. D., Peng, C. and Nahomial, C. S. 1991. Actions of catecholamines peptides and sex steroids in regulation of gonadotropin-II in goldfish. Pages 30-34. In: Patiño, R. 1997. Manipulations of the Reproductive System of Fishes by Means of Exogenous Chemicals. *The Progressive Fish Culturist* 59:118-128.
- *Peters, H. 1978. Folliculogenesis in Mammals. In: R. E. Jones (Editor). *The Vertebrate Ovary*. Plenum Press. New York Pp.121-144.
- *Querat, B., Sellouk, A. y Salmon, C. 2000. Phylogenetic analysis of the vertebrate glycoprotein hormone family including new sequences of sturgeon (*Acipenser baeri*) beta subunits of the two gonadotropins and the thyroid-stimulating hormone. *Biol Reprod.* 63: 222-228.
- *Ramírez†, S. R. 2006. Biología reproductiva y ontogenia de *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes, 1835) (Pisces: Atherinopsidae) en condiciones de laboratorio. Tesis Doctoral. Instituto Politécnico Nacional. México, D. F. 154 p.
- *Redding, J. M. y Patiño, R. 1993. Reproductive physiology. In: Evans, D. H. (Editor). *The physiology of fishes*: CRC Press, Boca Raton Florida. Pp 503-534.

Literatura Citada

- *Rodríguez, G. M. 1992. *Técnicas de Evaluación Cuantitativa de la Madurez Gonádica en Peces*. A.G.T. Editor. México. D. F. 79 p.
- *Rodríguez, L., Begtashi, I., Zanuy, S., Shaw, M. y Carrillo, M. 2001. Changes in plasma levels of reproductive hormones during first sexual maturation in European male sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) under artificial day lengths. *Aquaculture* 202: 235-248
- *Rojas, C. P. 2006. Reproductive aspects of "claral prieto" *Chirostoma attenuatum* (Meek, 1902) of Lake Pátzcuaro, Michoacán. New topic on atherinopsids of Mexico. *Hidrobiológica*: 16(1): 1-9.
- *Rosas, M. 1970. *Pescado blanco (Chirostoma estor) su fomento y su cultivo en México*. Series de divulgación Instituto Nacional de la Pesca, México. Instituto Nacional de Investigaciones Biológico Pesqueras SIC. Inst. No.2, 79 p.
- *Rosas, M. 1981. *Biología acuática y piscicultura en México*. Dirección General de Ciencia y Tecnología del Mar. SEP. 378 p.
- *Rosas-Monge, C. 1994. Cultivo experimental de crías de pez blanco *Chirostoma estor estor* Jordan 1873 (Pisces: Atherinidae), en jaulas de cultivo y bajo régimen alimenticio de cinco dietas. Tesis Licenciatura, Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 168 p.
- *Rossenblum, M., Pudney, J. y Callard, I. 1987. Gonadal morphology enzyme histochemistry and plasma steroid levels during the annual reproductive cycle of male and female brown bullhead catfish *Ictalurus nebulosus*. Lesueur. *J. Fish Biol.* 31:325-341.
- *Rush, M. R., Minckley, W. L. y Mark, N. S. 2005. *Freshwater Fishes of Mexico*. The University of Chicago Press Chicago and London. 1ª edición, USA. 490 p.
- *Russell, J. R. 1998. The Pineal Gland. *Endocrinology*. 20: 240-256.
- *Salgado-Ugarte I. H. 1992. *El análisis exploratorio de datos biológicos. Fundamentos y aplicaciones*. Marc Ediciones. FES- Zaragoza, UNAM, México 243 p.
- *Sánchez, P. S. 1992. Biología Reproductiva del Charal Blanco *Chirostoma grandocule* (STEINDACHNER, 1894 – Pisces: ATHERINIDAE), del lago de Pátzcuaro, Mich. México. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán México. 62 p.
- *Sasso, Y. L., Gutiérrez, M. R., Casas, N. F. y Chávez, S. S. 1997. *Estudio de la Factibilidad Técnica, Económica y Financiera para el cultivo de Pescado Blanco en Jalisco*. SEMARNAP. Subsecretaría de Pesca, Dirección General de Acuacultura. Acuagranjas. Consultores en Acuacultura S. A. de C. V. México, 223 p.
- *Schulz, R. W., Van der Carput, L., Janssen-Dommerholt, J. y Goos H. J. Th. 1993. Sexual steroids during puberty in male African catfish (*Clarias gariepinus*): serum levels and gonadotropin-stimulated secretion *in vitro*. *J. Comp. Physiol* 164: 195-205.
- *Segura, G. V. 1997. Ecología reproductiva del pez blanco *Chirostoma estor estor* Jordan, 1879 (Pisces: Atherinidae) lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. Tesis Maestría en Biología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. México 97 p.
- *Selman, K., Wallace, R. A. y Barr, V. 1986. Oogenesis in *Fundulus heteroclitus*. V. The relationship of Yolk vesicle formation and cortical alveoli. *J. Exp. Zool.* 246, 42-56.

Literatura Citada

- *Selman, K., Wallace, R. A. 1989. Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zool. Sci.* 6: 211-231.
- *Smith, J. S. y Thomas, P. 1990. Binding characteristics of the hepatic estrogen receptor of the spotted seatrout *Cynoscion nebulosus*. *General Comparative Endocrinology* 77: 29-42.
- *Solórzano, P. A. 1961. Contribución al conocimiento de la biología del charal prieto (*Chirostoma bartoni*; Jordán y Evermann, 1896), del lago de Pátzcuaro. *Sria. de Ind. y Com. Dir. Gral. de Pesca e Indus. Conex. México, D. F.* 70 p.
- *Stata Corp. 2003. Stata Statistical Software; Release 8.0. College Station, TX: Stata Corporation.
- *Swanson, P. 1991. Salmon gonadotropins: Reconciling old and new ideas. In: Scott, A. P., Sumpter, J. P., Kime, D. E. and Rolfe, M. S. (Eds.). *Proc. of Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. 91, Sheffield, Pp. 2-7.
- *Takashima, F. y Hibiya, T. 1995. *An Atlas of Fish Histology. Normal and Pathological Features*. Second Edition. Gustav Fischer Verlag. Kodansha Ltd. Tokyo. 195 p.
- *Téllez-Pérez T. a. 1985. Contribución al conocimiento de la biología de los machos del charal *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes) del embalse Huapango, Edo. De México. Tesis de Licenciatura. ENCB, IPN, México, 36 p.
- *Thomas, P. 1994. Hormonal control of final oocyte maturation in sciaenid fishes. In: Davey, K. G., Peter, R. E. and Tobe, S. S. (Eds.). *Perspectives in comparative Endocrinology*. National Research Council of Canada. Ottawa, Pp 619-625.
- *Tokarz, R.R. 1978. Oogonial proliferation, oogenesis, and Folliculogenesis in onmammalian vertebrates. en: Takashima, F. y Hibiya, T. 1995. *An Atlas of Fish Histology. Normal and Pathological Features*. Second Edition. Gustav Fischer Verlag. Kodansha Ltd. Tokyo. 195 p.
- *Torres, J. R. 1978. Anatomía e histología del tubo digestivo de *Chirostoma promelas* con análisis de los hábitos alimenticios. Tesis de licenciatura, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México, 82 pp.
- *Trudeau, V. L. y Peter, R. E. 1995. Functional interactions between neuroendocrine systems regulating GnRH release. In: Goetz, F. W., Thomas, P. (Eds.). *Reproductive Physiology of Fish*, Fish Symposium 95: Austin TX. Pp 44-48.
- *Tyler, C. R. 1991. Vitellogenesis in salmonids. In: Scott, A. P., Sumpter, J. P., Kime, D. E. and Rolfe, J. (Eds.). *Proc. Fourth Int. Symp. Reproductive Physiology of Fish*. Sheffield, U. K: Sheffield University Press. Pp. 295-299.
- *Tyler, C. R. y Sumpter, J. P. 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 6, 287-318.
- *Uribe, G. E., Moncayo, L. M. E., Garibay, G. R. 1998. Desarrollo y madurez testicular del charal *Chirostoma humboldtianum* (Pisces: Atherinidae), del embalse Huapango, Estado de México. *Hidrobiológica* 8 (Suplem. 1): 9-18.

Literatura Citada

- *Van der Kraak, G., 1992. Mechanism by which calcium ionophore and phorbol ester modulate steroid production by preovulatory ovarian follicles. *J. Exp. Zool* 262: 271-278.
- Van Der Kraak, G. and Wade, M. G. 1994. A comparison of signal transduction pathways mediating gonadotropin actions in vertebrates. In: Davey, K. G., Peter, R. E., Tabe, S. S. (Eds.). *Perspectives in comparative endocrinology*. Ottawa, Canada: National Research Council of Canada. Pp. 59-63.
- *Van Oordt, P. G. W. J. and Goos, H. J. T. H. 1987. The African Catfish, *Clarias gariepinus*, a Model for the Study of Reproductive Endocrinology in Teleosts. *Aquaculture* 62: 15-26.
- *Villagómez- González, C. M., Islas Solís, Valencia-Hernández, A. 1997. Estudio poblacional de *Chirostoma humboldtianum* en la presa Villa Victoria. Edo. De México (Abril de 1994-Enero de 1995). Resúmenes del V Congreso Nacional de Ictiología, Mazatlán, Sinaloa. México p 31.
- *Wallace, R. A. y Selman, K., 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Am. Zool.* 21: 325-343.
- *Wallace, R. A. y Selman, K., 1990. Ultrastructural Aspects of Oogenesis and Oocyte Growth in Fish and Amphibians. *Journal Electron Microsc. Technique* 16: 175-201.
- *Webb, A. H. M., Van Eenennaam, J. P., Feist, G. W., Linares, C. J., Fitzpatrick, M. S., Schreck, C. B. y Doroshov, S. I. 2001. Effects of thermal regime on ovarian maturation and plasma sex steroids in farmed white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Aquaculture* 201: 137-151.
- *Weil, C. 1992. Evidence of GnRH receptors in culture pituitary cells of the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus* W). *Gen. Comp. Endocrinol.* 85: 156-162.
- *White, B. N. 1985. Evolutionary relationships of the Atherinopsidae (Pisces: Atherinidae). *Contrib. Sci. Nat. Hist. Mus.* 268: 1-20.
- *Yoneda, M., Tokimura, M., Fujita, H., Takeshita, N. Takeshita, K. Matsuyama, M. y Matsuura, S. 1998. Reproductive cycle and sexual maturity of the anglerfish *Lophiomus setigerus* in the East China Sea with a note on specialized spermatogenesis. *Journal of Fish Biology* 53, 164-178.
- *Yoshikuni, M. y Nagahama, Y. 1991. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Bull. Inst. Zool. Acad. Sin. Monogr* 16, 139-172.
- *Young, G., Adachi, S., y Nagahama, Y. 1983. Role of ovarian Thecal and granulosa layers in gonadotropin-induced synthesis of a salmonid maturation-inducing substance (17α , 20β -dihidroxy-4-pregnen-3one). *Development Biology* 118: 1-8.
- *Young, G., Kagawa, H., y Nagahama, Y. 1982. Secretion of aromatizable androgens by thecal layers during estradiol- 17β production by ovarian follicle of amago salmon *Oncorhynchus rhodurus*, in vitro. *Bromed Res.* 3, 659-667.
- *Weil, C. 1992. Evidence of GnRH receptors in cultured pituitary cells of the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus* W). *Gen. Comp. Endocrinol.* 85: 156.

Literatura Citada

- *Zanuy, S. y Carrillo, M. 1987. La reproducción de los teleósteos y su aplicación a la acuicultura. *In: Reproducción en Acuicultura*, J. Espinosa de los Monteros y U. Lasbarta. Editorial Plan de Formación de Técnicos Superiores en Acuicultura. Madrid. 131 p.
- *Zar, J. H. 1999. *Biostatistical Analysis*. Fourth edition. Prentice-Hall, , New Jersey. USA. 662 p.
- *Zou JJ, Trudeau VL, Cui Z, Brechin J, Mackenzie K, Zhu Z, *et al.* 1997. Estradiol stimulates growth hormone production in female goldfish. *Gen Comp Endocrinol* 106:102-112

Sitio Web: smn.cna.gob.mx

ANEXO 1

Fundamentos y descripción de las técnicas histológicas empleadas.

Fijación del tejido. Conforme a la técnica de inclusión en parafina, después de que el ovario fue obtenido y descrito inmediatamente, se sumergió en una solución de Zamboni modificado (Bouin modificado); el cual tiene la ventaja que posee la solución fijadora de *Bouin-Hollande* la cual fija eficientemente a los ovocitos en etapas tempranas de desarrollo, y además la ventaja de la solución de *Gilson* de hacerlo eficientemente con los estadios más avanzados (Estrada *et al.*, 1982). En esta investigación se empleo el Bouin modificado, el ovario se colocó en la solución conservadora durante dos días y posteriormente se lavo perfectamente con una solución etílica al 50% GL; de esta manera se conservó hasta el siguiente procesamiento (Rodríguez, 1992).

Deshidratación, Aclaración y Per-función. Los ovarios fueron seccionados transversalmente en tres porciones: parte anterior, media y posterior (tomando como referencia la posición de la cabeza del pez); lo anterior con el objeto de caracterizar la estructura del ovario. El tejido fue deshidratado empleando soluciones etílicas de concentración ascendente durante varios periodos de tiempo: Alcohol etílico al 50% (1 hr), al 60% (1 hr), al 70 % (1 hr), al 70% nuevamente (2 hr), al 80% (1 hr), al 96% (2 hr) y absoluto (1 hr), en un equipo *Histoquinete* automatizado para deshidratación marca LEICA, modelo TP 1020. Posteriormente y después de etiquetar cada porción, el tejido se aclaró son alcohol-Xileno (30 minutos), Xileno (40 minutos), y finalmente se prefundió sumergiéndolo en parafina-Xileno (1 hr) y parafina (marca Merk) de punto de fusión de 49 °C (1 hr) (Estrada *et al.*, 1982; Uria *et al.*, 1998).

La inclusión, es una operación mediante la cual se hace penetrar en el tejido deshidratado una materia solidificante que tiene la consistencia del tejido y facilita la ejecución de cortes finos. El método empleado fue la inclusión parafina grado reactivo de punto de fusión de 49 °C; empleando para ello cassetes de inclusión de diferentes tamaños de acuerdo al tamaño de la muestra (cada sección de los ovarios, variaron de dimensiones según su desarrollo), para tal fin se empleó un sistema para inclusión marca LEICA, modelo EG 114OC y una placa de enfriamiento del mismo modelo y marca.

Cortes histológicos. La elaboración de laminillas consistió, en realizar cortes en micrótomos lo suficientemente delgadas, para que la luz del microscopio lograra atravesarlas y así permitir apreciar todas las estructuras histológicas. Los cortes se efectuaron con un equipo de micrótomos marca Microm (model HM 315, Leica, Walldorf, Germany). El grosor del corte de ovario, fue de 5 micras (conforme a lo sugerido por Uria y colaboradores, 1998), lo anterior permitió obtener cortes precisos y firmes. El eje de los cortes fue de tipo transversal, estos se recibieron en un baño de flotación a 50 °C con gelatina previamente disuelta. Los cortes se capturaron en serie en portaobjetos respectivos y se secaron a la estufa por 35 °C (1 h).

La tinción. Tiene como objetivo que las estructuras celulares y tisulares queden contrastadas y nítidas a la observación, para que de esa forma la identificación y descripción histológica sea adecuada y precisa. Para la tinción del tejido ovárico se empleó la técnica de tinción diferencial: Hematoxilina-Eosina (HE), que ha demostrado ser adecuada en trabajos de histológica general. Como lo indica la técnica, para teñir los cortes fue indispensable previamente desparafinarlos e hidratarlos; para lo cual, los cortes se sumergieron en soluciones seriadas de Xilenos, posteriormente y conforme al protocolo de tinción los tejidos se someten a diferentes sustancias y a los colorantes de Hematoxilina de H  rris y en algún momento de la procedimiento en Eosina Amarillenta (Estrada *et al.*, 1982; Uria *et al.*, 1998). Finalmente, las preparaciones son montadas en resina sintética (marca Entellan Merk), para su conservación hasta el momento de la observación.

ANEXO 2

Radio Inmunoanálisis.

Fundamento de la técnica. Muchas hormonas presentes en líquidos fisiológicos como suero y orina se cuantifican por la técnica de radioinmunoensayo o radioinmunoanálisis. Aunque hay diversas variantes de la técnica, en el ensayo se utiliza un sistema antígeno-anticuerpo "calibrado", en donde el antígeno (la hormona) se encuentra acoplada a un isótopo radioactivo (comúnmente ^3H). En las condiciones estandarizadas del ensayo, una cantidad determinada de anticuerpo se combina con una cantidad precisa de hormona radioactiva. El complejo soluble hormona-anticuerpo se hace reaccionar con un segundo anticuerpo dirigido contra el primero, en concentraciones que permiten la formación de precipitados, los cuales se separan de la fase líquida por centrifugación, y se preparan para cuantificar la radioactividad incorporada, en un detector de radioactividad (Rojas, 1996).

La preincubación del anticuerpo anti-hormona con un líquido biológico que contiene la hormona conducirá a su interacción y a su combinación, de tal manera que, dentro de cierto intervalo, una pequeña cantidad de hormona presente neutralizará a una porción igualmente pequeña de anticuerpo, y una mayor cantidad de la misma neutralizará a una mayor cantidad de anticuerpo, y así sucesivamente. La adición ahora de una cantidad precisa de la hormona radioactiva conducirá a la competencia entre ella y la hormona que contiene la muestra biológica, al combinarse sólo con aquella porción de anticuerpo que aún permanece libre. Al agregar el segundo anticuerpo, el complejo precipitado contendrá menos material radioactivo que un complejo formado sólo por el anticuerpo anti-hormona y la hormona radioactiva. La disminución en la radioactividad recuperada será directamente proporcional a la cantidad de hormona presente en el espécimen biológico. Tratándose del mismo antígeno, la hormona no radioactiva presente en el organismo biológico competirá con la hormona radioactiva por los sitios de combinación del anticuerpo (Chard, 1978; Herrera, *et al.*, 1993).

La estandarización de la técnica de Radio-Inmuno-Análisis (RIA), para mediciones de hormonas esteroides sexuales, está perfectamente documentada particularmente en

mamíferos (Rojas, 1996), y su empleo ha impulsado, la comercialización de reactivos químicos, productos sucedáneos, equipo de alta tecnología e inclusive equipo sistematizado (KITS), para su rápido y efectivo uso. Sin embargo, el uso de esta técnica para la medición de "especies menores" (aves, anfibios reptiles y peces), representa un reto por varias razones, entre las que destacan, las concentraciones desconocidas de éstas hormonas, la presencia de sustancias como proteínas y lípidos en el suero, que pudieran interferir en la detección de estos exteriores en el suero, y sobre todo de los pequeños volúmenes de suero sanguíneo, que se obtienen en dichos animales.

Validación de las técnicas. En virtud de la dificultad en la obtención de las muestras sanguíneas, los cuales entre otros factores presentaban volúmenes muy pequeños que oscilan entre 18 a 130 microlitos (μL), y antes de iniciar con las mediciones en sueros sanguíneos de pez banco se procedió a validar y estandarizar las técnicas de medición del RIA. Este procedimiento consistió en: a) elaboración de curvas estándar, muy sensibles, capaces de medir hasta cinco pg (picogramos) de esteroide 17β -estradiol ($17\beta\text{-E}_2$) y de 17α -hidroxi-progesterona (17-P_4), b) evaluar el porcentaje de hormonas radioactivas (^3H Tritio) recuperada, cuando se purifica la muestra, haciéndola pasar por un cartucho de filtración Sep-Park C18 (marca Waters- Corporation), y recolectando por medio de eluciones con agua para 17β -estradiol y metanol para 17α -hidroxi-progesterona respectivamente; c) una prueba de detección para elegir el volumen de suero mínimo a utilizar (50 o 100 microlitos), por medio de bioensayos, con suero de peces machos, a los cuales se le agregó previamente masa fría (hormona no-radioactiva). Lo anterior representó, trabajo de laboratorio necesario que condujo a metodologías estandarizadas, que sirvieron de fundamento para adecuar el uso del RIA en las mediciones de hormonas en suero de pez blanco.

Se elaboraron sendas curvas estándar, muy sensibles, capaces de medir hasta cinco pg de esteroide 17β -Estradiol (E_2) y 17α -hidróxi-progesterona (17-P_4) Para tal efecto, se prepararon ex-profeso, las siguientes soluciones y sustancias: 1) soluciones amortiguadoras (Buffer de fosfatos de concentración 0.1 y 0.2 M gelatina-salina), para el uso de moléculas pequeñas como son las hormonas esteroides (Aída, 1988); 2) la suspensión nueva de Carbón-Dextran en solución amortiguadora de fosfatos (GPBS). Se tuvo especial cuidado en preparar soluciones de concentración conocida de anticuerpos

específicos para 17β -Estradiol (E_2) y 17α -hidróxi-progesterona ($17-P_4$) respectivamente (anticuerpo del conejo 4 -clave del laboratorio-). La preparación de estándares probablemente es el paso más importante, que asegura que la calidad de los resultados de un sistema de unión se mantenga por largo tiempo. Con base en lo anterior, en el experimento, se preparó cuidadosamente una batería de soluciones de concentraciones conocidas que contenía la hormona "fría", las cuales oscilaban entre 2 y 512 pico-gramos por mililitro de suero (pg/ml) de hormona, a partir de soluciones de trabajo de cada hormona (soluciones Stock). Finalmente la "marca" o hormona con radioactividad, se empleo la registrada en el LEC. En todos los casos, se corroboró las concentraciones de todas estas soluciones y preparaciones con ayuda de un contador de centelleo de rayos beta marca BECKMAN LS 6 500 (Multi-Purpose-Scintillation Counter).

Otro procedimiento clave, fue evaluar el porcentaje de recuperación de hormonas radioactivas que se obtenía al hacer pasar suero de peces machos de la familia *Ciprinidae* (carpas) (por la dificultad de contar con mas sueros de peces blancos), con marca radioactiva (^3H Trítio) y recuperarlo por medio de elusiones con agua para 17β -Estradiol y metanol para 17α -hidroxi-progesterona respectivamente por los cartuchos purificadores, procedimiento que se empleo más adelante con las muestras de sueros problema (detallado abajo). Lo anterior, dio como resultado, que en dichos cartuchos y con las elusiones con estos dos solventes, se recuperaba un 80 % de la marca.

Por último, se realizó otra prueba, para conocer la sensibilidad de nuestra detección, con el suero de carpa de machos, al cual se le adicionó hormona fría (masa), y se le efectuó el mismo procedimiento de filtrado y lavado, esto con volúmenes de suero de 50 y 100 μ L comprobando que con volúmenes de hasta 20 μ L de suero de pez, se detecta la hormona con una alta eficiencia.

Publicación derivada de la tesis.



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

REVISTA VETERINARIA MÉXICO

Cd. Universitaria, D.F., 24 de octubre de 2007



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

SR. (S) DR. (S)
GUILLERMO ARTEMIO BLANCAS ARROYO
IRENE DE LOS ÁNGELES BARRIGA SOSA
TOMÁS MORATO CARTAGENA
CARLOS MANUEL ROMERO RAMÍREZ
JOSÉ LUIS ARREDONDO FIGUEROA

Comunico a usted (es) que su artículo titulado:

Desarrollo ovárico y su relación con las concentraciones séricas de
17 β -estradiol y 17 α -hidroxi-4-pregnen-3-ona en hembras de primera
maduración de pez blanco *Chirostoma humboldtianum* (Atheriniformes:
Atherinopsidae)

Artículo Científico

Ha sido aceptado por el Comité Editorial, para su publicación en la
Revista "Veterinaria México", órgano oficial de la Facultad de
Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM, en el

Volumen 39 Número 1

Atentamente:

MVZ. RAYMUNDO MARTÍNEZ PEÑA
Director Técnico de la Revista

Archivo:
RM177ggm

ACMA
XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACIÓN
ARCHIVO HISTÓRICO

Desarrollo ovárico y su relación con las concentraciones séricas de 17β -estradiol y 17α -hidroxi-4-pregnen-3-ona en hembras de primera maduración de pez blanco *Chirostoma humboldtianum* (Atheriniformes: Atherinopsidae)

¹Guillermo Artemio Blancas Arroyo* Irene de los Ángeles Barriga Sosa** Tomás Morato Cartagena** Carlos Manuel Romero Ramírez** José Luis Arredondo Figueroa***[‡]

Abstract

The first reproductive cycle of 50 females of the shortfin silverside, *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes) in culture conditions was analyzed. Ovarian developmental stages, gonadosomatic (GI) and hepatosomatic (HI) indexes are described. Histological description of the ovaries and quantification of serum levels of estradiol (E_2) and 17α -hydroxy-4-pregnen-3-one ($17-P_4$) by radioimmuno assay were performed. Results showed a spawning season of more than six months. Females initiated spawning at the age of one year. Four ovarian maturation stages (I to IV) were determined during the spawning season and one during the non-spawning season (V), the last one showed ovaries with a non-defined pattern of development. The GI and HI indexes values indicate a positive lineal relation to body weight only during the reproductive season ($r^2 = 0.74$ and $r^2 = 0.86$, $P \leq 0.05$, respectively). Histological analysis of the ovaries indicated that the species correspond to the pattern described as multiple-group-synchronous. The follicular

Este trabajo forma parte de la tesis doctoral del primer autor en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

*Carrera de Biología, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. 5 de Mayo y Fuerte de Loreto, Colonia Ejército de Oriente, México, D. F., 09230, correo electrónico: quiblaro@aol.com

**Planta Experimental de Producción Acuícola, Departamento de Hidrobiología y Departamento de Biología de la Reproducción, División de CBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Colonia Vicentina, 09340, México, D.F., Apartado postal, 55-535, Tel.: (01) 5804 6585 y (01) 5804 4708, Fax: (01) 58044740, correo electrónico: afjl@xanum.uam.mx y crr@xanum.uam.mx

*Correspondencia: Dr. José Luis Arredondo Figueroa, Tel.: (01) 5804 6585; fax: (01) 5804 4738; correo electrónico: afjl@xanum.uam.mx

population showed reproductive activity during the first stages of maturation with a predominant population of pre-vitellogenic follicles. As the ovarian maturation increased, the presence of all the follicular developmental stages was observed, with a tendency of an increase of vitellogenic and mature follicles. The concentration of circulating sexual steroid hormones of estradiol (E_2) and 17 α -hydroxy-4-pregnen-3-one (17-P₄) were high during stage I (2.5 ± 0.7 ng/mL and 2.4 ± 0.3 ng/mL for E_2 and 17-P₄, respectively); a decrease was observed during stage II, and the highest values were observed in stage IV (7.6 ± 2.1 ng/mL for E_2 and 1.8 ± 0.9 ng/mL for 17-P₄). The same pattern was observed during non-spawning season (ANOVA $P < 0.05$), suggesting an early esteriodogenic activity in immature females. Furthermore, the species maintains its hormonal capacity during the post-spawning season, as it is supported by their follicular composition. These are the first findings on the reproductive physiology of the shortfin silverside fish, which will allow to have a better understanding of the mechanisms involved in their reproductive processes and to improve the mechanisms utilized for their reproduction in culture conditions and for the production of eggs and larvae.

Key words: SHORTFIN SILVERSIDE; *CHIROSTOMA HUMBOLDTIANUM*, OVARIAN DEVELOPMENT; SEXUAL STEROID HORMONES.

Resumen

Se analizó el primer ciclo reproductivo de 50 hembras de pez blanco *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes) en condiciones de cultivo. Se describieron los estadios de desarrollo ovárico y los índices gonadosomático (IG) y hepatosomático (IH). Se realizó una descripción histológica de los ovarios y se midieron los niveles séricos del estradiol (E_2) y de la 17 α -hidroxi-4-pregnen-3-ona (17-P₄) por radioinmunoanálisis. Los resultados mostraron una primera época reproductiva de más de seis meses. Las hembras iniciaron sus desoves a la edad de un año. Se identificaron cuatro estadios de maduración ovárica (estadios I al IV) en la época de desoves y uno más (V) en la época no reproductiva, este último no tuvo un patrón de desarrollo definido. Los valores de los índices IG e IH mostraron una relación lineal positiva con el peso corporal únicamente en la época reproductiva ($r^2 = 0.74$ y $r^2 = 0.86$, $P \leq 0.05$, respectivamente). El análisis histológico de los ovarios indicó que la especie se clasifica como sincrónica por grupos múltiples. Los primeros estadios de maduración gonadal fueron caracterizados por ovarios cuyas poblaciones foliculares estuvieron compuestas predominantemente por folículos pre-

vitelinos. Conforme avanzó el proceso de maduración, se observaron todos los estadios de desarrollo folicular, con tendencia al incremento de folículos vitelinos y maduros. Durante el estadio I, las concentraciones de las hormonas esteroideas sexuales circulantes de estradiol (E_2) y de la 17α -hidroxi $\rightarrow$ 4-pregnen-3-ona ($17-P_4$) fueron altas (2.5 ± 0.7 ng/mL de E_2 y 2.4 ± 0.3 ng/mL de $17-P_4$), se observó un decremento durante el estadio II y los valores más altos se registraron en el estadio IV (7.6 ± 2.1 ng/mL de E_2 y 1.8 ± 0.9 ng/mL de $17-P_4$). Este mismo patrón fue observado durante la época de no desoves (ANDEVA $P < 0.05$); estos resultados son los primeros hallazgos en la fisiología reproductiva del pez blanco, los cuales sugieren una temprana actividad esteroideogénica en hembras inmaduras, además de que esta especie conserva su capacidad hormonal en la época posdesove, sustentada en su composición folicular. Lo anterior ayudará para comprender mejor los mecanismos involucrados en los procesos reproductivos y servirá de base para lograr su reproducción controlada y la obtención de huevos y larvas en condiciones de cultivo.

PALABRAS CLAVES: PEZ BLANCO; *CHIROSTOMA HUMBOLDTIANUM*; DESARROLLO OVÁRICO; HORMONAS ESTEROIDES SEXUALES.

Introducción

La reproducción en los peces teleósteos, como en todos los vertebrados, está controlada por ritmos biológicos endógenos,¹ y éste es un proceso que demanda una coordinación fisiológica, la cual, a su vez, está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y estimulado por factores ambientales como el fotoperiodo y la temperatura.² La asociación entre el desarrollo gonadal y niveles plasmáticos de hormonas esteroideas ha demostrado ser una herramienta importante para comprender el control endocrino de la reproducción en los peces. Se sabe que en las hembras de peces teleósteos, la vitelogénesis y la maduración folicular son reguladas por las gonadotropinas GtH I y GtH II a través de hormonas esteroideas que son secretadas por las células foliculares que rodean al ovocito. La función principal del 17β -estradiol (E_2) es estimular la síntesis hepática de la vitelogenina (VTG) y de lipoproteínas, que son acumuladas en el ovocito. Los esteroideos C21, como la $17,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona ($17,20\beta-P_4$) y la $17,20\beta,21$ -trihidroxi-4-pregnen-3-ona ($17,20\beta,21-P_4$), a su vez, inducen la maduración, por lo que son llamadas hormonas inductoras de la maduración (HIM).³⁻⁹ El estradiol circulante interviene en la

regulación positiva y negativa de la secreción de las gonadotropinas en la hipófisis y en la formación y liberación de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) en el hipotálamo.

En las hembras de peces teleósteos, los niveles circulantes de E_2 disminuyen después de que se ha completado el crecimiento del ovario y el desarrollo de los ovocitos, cuando la hembra se encuentra preparada para el desove, hay incremento de la gonadotropina II (GtH II), que induce la activación del proceso esteroidogénico y síntesis y liberación de la HIM.^{2,10-13}

El pez blanco pertenece al género *Chirostoma* y son peces endémicos de la Meseta Central de México, donde sustentan la pesca ancestral en México. En condiciones naturales, el pez blanco de la especie *C. humboldtianum* presenta una amplia temporada reproductiva con desoves múltiples.^{14,15} Sin embargo, los conocimientos de su biología reproductiva son escasos. Particularmente en hembras, el conocimiento del proceso es fundamental para el control de la reproducción, sobre todo en especies que presentan dificultades en su cultivo, como los peces blancos.¹⁴

Aquí se presenta el primer ciclo reproductivo de hembras de *C. humboldtianum* criadas en cautiverio, los estadios de maduración ovárica y cambios en la composición folicular asociados con los niveles circulantes de 17β -estradiol (E_2) y la 17α -hydroxi-4-pregnen-3-ona (17-P₄), durante las épocas de desove y de descanso reproductivo.

Material y métodos

Reproductores

Los progenitores de *C. humboldtianum* fueron inicialmente capturados de una población silvestre en la presa "Las Tazas", municipio de Jocotitlán, Estado de México, México, y mantenidos en condiciones de cultivo en las instalaciones de la Planta Experimental de Producción Acuicola (PExPA), facilitadas por la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I). La población en estudio (F1) consistió en peces de sexo indistinto (n = 226). Los organismos fueron agrupados en tres cohortes de acuerdo con su edad: la cohorte 1, de 10 meses, n = 158 y con promedio de longitud total (LT) y peso (PT) de 94.2 ± 1.6 mm y 6.6 ± 1.6 g, respectivamente; cohorte 2, de 11 meses, n = 42 y con LT y PT de 116.8 ± 0.5 mm y 11.5 ± 1.9 g, respectivamente; cohorte 3, de 12 meses, n = 26 organismos, con LT y PT de 133.9 ± 2.3 mm y 19.6 ± 6.9 g, respectivamente. Cada

cohorte fue cultivada por separado en un estanque de cuatro mil L de capacidad. Cada estanque contaba con un sistema cerrado de recirculación, la calidad del agua y estrategias de alimentación fueron las recomendadas por Mares y Morales¹⁶ y Blancas *et al.*^{14,17} El sexo de todos los peces fue determinado manualmente.

Desarrollo ovárico

Se capturaron 50 hembras de todos los cohortes (30 en la temporada reproductiva y 20 durante la época de descanso). El estudio del desarrollo ovárico inició con los peces de 10, 11 y 12 meses de edad. Las hembras se anestesiaron con benzocaína diluida en alcohol etílico al 1.6%, y sus pesos y longitudes totales se registraron con una balanza digital^{2*} de 0.1 g de precisión y un ictiómetro graduado en milímetros, respectivamente. Se extrajeron los ovarios y el hígado de cada hembra, y se pesaron en una balanza analítica^{3*} de 0.0001 g de precisión, de igual forma se registró el color y la apariencia de los ovarios. Se midió el porcentaje de espacio visceral (PEV) ocupado por los ovarios mediante el método volumétrico;¹⁸ con estos valores se calcularon los índices gonadosomático (IG) y hepatosomático (IH) de acuerdo con Tyler y Sumpter.¹⁹ Se caracterizaron los estadios de madurez ovárica de acuerdo con Solórzano,²⁰ quien indica una clasificación para peces del mismo género.

Composición folicular

Se describió el análisis histológico para los 50 pares de ovarios, que se conservaron en solución Bouin,²¹ luego se procedió a su deshidratación, aclaración, prefunción y a su inclusión en parafina⁴ de punto de fusión de 49 a 50°C. Se efectuaron cortes transversales de 8 µ de profundidad utilizando un micrótopo Microm;⁵ después, los cortes se desparafinaron, se tiñeron con hematoxilina de Harris-Eosina amarillenta (H-E) y finalmente se conservaron en resina Merk.²²

Para describir la estructura histológica de los ovarios, las preparaciones histológicas se observaron con un microscopio óptico⁶. De acuerdo con lo descrito por

^{2*} OHAUS, modelo GT 4800, Estados Unidos de América.

³ OHAUS, modelo AP 110S, Estados Unidos de América.

⁴ Paraplast-Merk, Estados Unidos de América.

⁵ Modelo HM 315, Leica, Walldorf, Alemania.

⁶ Olympus CX31, Olympus, Corporate Center Drive, Melville, Estados Unidos de América.

Wallace y Selman,²³ se realizó la identificación y cuantificación de los distintos estadios de desarrollo folicular. Se identificaron los siguientes estadios: a) cromatina nuclear = folículos primarios (FP); b) perinuclear = folículos secundarios (FS); c) alvéolo cortical = folículos terciarios (FT); d) estado vitelogénico = folículos vitelinos (FV), y e) estado de maduración = folículos maduros (FM). Para conocer la composición folicular que caracteriza cada estadio de maduración ovárica, se necesitaron cinco preparaciones histológicas de ovarios en el estadio de maduración ovárica I, nueve en el estadio II, 14 en el estadio III y 12 en el estadio IV, para lo cual se identificaron y contaron 100 folículos de cada estadio de desarrollo.

Hormonas esteroides

Se analizaron 35 muestras de suero. A causa del poco volumen recolectado, nueve de ellas fueron muestras compuestas de sueros de hembras que presentaron el mismo estadio de madurez ovárico y composición folicular. Las hormonas esteroides se evaluaron mediante la técnica de radioinmunoanálisis (RIA), basada en los principios metodológicos descritos por Herrera *et al.*²⁴ y Carolsfeld *et al.*,²⁵ empleando H³ y anticuerpos altamente específicos. La sangre fue recolectada mediante punción cardíaca y se obtuvo el suero por centrifugación (15 min a 805 g y 4°C). Las muestras de suero se purificaron con filtros⁷ y se obtuvo 80% de recuperación de cada esteroide. Cada muestra de suero purificada se recuperó en dos fracciones: una con etanol y la otra con agua destilada, el alcohol fue evaporado para después unir ambas fracciones (1 mL). Finalmente, el suero se diluyó a un volumen final de 2 mL con Gel-PBS (0.2 M, 17.6 g de NaCl y 2.0 g de gelatina/L). Las curvas estándar fueron sensibilizadas hasta 5 pg/mL. Se tomaron alícuotas de 400 µL por duplicado para evaluar con RIA y por separado el E₂ y la 17-P₄. El análisis se realizó conforme a cada estadio de madurez ovárica y composición folicular para ambas épocas.

Análisis estadístico

La base de datos fue capturada en el software Excel. Se realizó un análisis de correlación (AC) para verificar las correspondencias del IG e IH con respecto al peso total de la hembra para las épocas reproductiva y de descanso.²⁶ Se empleó un análisis exploratorio

⁷ Sep-Park C18, Waters- Corporation, Estados Unidos de América.

de datos (AED) de diagrama de cajas,²⁷ para conocer la conducta de los niveles hormonales entre sí y en ambas temporadas.²⁸ Se utilizó una prueba de ANDEVA de una sola vía no paramétrica para determinar diferencias significativas entre los niveles hormonales encontrados conforme a cada estadio de desarrollo.

Resultados

Primera época reproductiva en las hembras

La población (las tres cohortes de edad) presentó una temporada reproductiva de seis meses (del 28 de enero al 15 de agosto, 2003). La época reproductiva inició con las hembras de un año de edad, cohorte 3 (Figura 1); mientras tanto, las hembras de la cohorte 2 iniciaron a la edad de 11 meses y tres semanas. De la misma forma, las hembras de la cohorte 1, con diez meses de edad, tuvieron sus primeras etapas de desove hasta que alcanzaron un año de edad.

El número de etapas de desove por cada cohorte indicó una significativa participación de las hembras de mayor edad, la cual correspondió a las cohortes 2 y 3, con 33 y 32 puestas, respectivamente, en tanto que las hembras más jóvenes tuvieron un total de 12 puestas. La cohorte 3 presentó una pausa de seis semanas sin desoves (del 10 de mayo al 2 de julio), en el transcurso de la época reproductiva. Asimismo, las hembras de la cohorte 2 se caracterizaron por presentar actividad continua y las hembras de la cohorte 1 tuvieron discreta pero constante actividad (menor número de desoves).

Desarrollo ovárico

De acuerdo con los resultados del IG, el PEV ocupado por los ovarios y la actividad sexual (desoves), fue posible distinguir durante la época de desoves cuatro estadios de maduración gonadal (I, II, III y IV) y un estadio más durante la época de descanso sexual (V) (Cuadro 1). Sin embargo, este último estadio estuvo caracterizado por ovarios que presentaron valores de IG y PEV similares a los estadios del I al III de la época reproductiva.

Los valores de IG e IH máximos y mínimos fueron 0.2 a 7.1 y 0.9 a 2.9, respectivamente, durante la época reproductiva, y de 0.3 a 3.5 y 1.2 a 22.2 en las hembras en la temporada no reproductiva, respectivamente. Ambos índices mostraron durante la época reproductiva una relación positiva con el peso corporal en el AC ($r^2 =$

0.74, $P \leq 0.05$ y $r^2 = 0.89$, $P \leq 0.05$, para el IG e IH, respectivamente), no así en la época de descanso ($r^2 = 0.3$, $P \leq 0.05$ y $r^2 = 0.17$, $P \leq 0.05$).

Composición folicular

El análisis histológico en el pez blanco mostró que en esta especie las hembras en sus gónadas contenían folículos en todos los estadios de desarrollo, tanto previtelinos (FP, FS y FT) como vitelinos (FV y FM). Durante la época de desove, se observaron cambios en los porcentajes de los diferentes folículos, lo que reflejó su actividad reproductiva. Los ovarios inmaduros estuvieron caracterizados por la dominancia de folículos primarios y secundarios, y mientras continuaba el proceso de maduración ovárica, se incrementó, sin un patrón definido, el número de folículos vitelinos y maduros. El reclutamiento de folículos primarios estuvo presente en todos los estadios de maduración ovárica (estadios II al V) (Figura 2). Una composición folicular similar se registró durante la época de descanso reproductivo, con la diferencia de que en este periodo no hubo hembras con ovarios bien desarrollados (estadio V). De las 30 hembras analizadas durante la época de desoves, 13 mostraron un estadio de maduración ovárica I; siete en estadio II; cuatro en estadio III y seis en estadio IV. Mientras tanto, durante la época de no desoves, las 20 hembras analizadas se encontraban en el estadio de desarrollo ovárico V (Cuadro 2).

Hormonas esteroides sexuales

Los niveles circulantes de hormonas esteroides de E_2 y de la $17-P_4$ detectados en las hembras del pez blanco, fluctuaron entre 0.56 a 9.68 ng/mL y de 0.53 a 2.55 ng/mL, respectivamente. La Figura 3 muestra los niveles hormonales promedio, agrupados de acuerdo con los estadios de maduración ovárica. Se detectaron niveles circulantes importantes en hembras inmaduras (estadio I) durante la temporada de desoves, alcanzando 2.5 ± 0.7 ng/mL de E_2 y 2.4 ± 0.3 ng/mL de $17-P_4$; se detectaron niveles en el estadio II de 1.7 ± 0.2 ng/mL de E_2 y 0.9 ± 0.2 ng/mL de $17-P_4$; y nuevamente en el estadio III, se observó incremento con niveles de 2.8 ± 0.6 ng/mL de E_2 y 1.4 ± 0.5 ng/mL de $17-P_4$. Los valores altos de E_2 se detectaron en el estadio IV (7.5 ± 2.1 ng/mL), mientras que los niveles de $17-P_4$ fueron similares al estadio II (1.8 ± 0.9 ng/mL).

Durante la temporada no reproductiva, los ovarios estaban en el estadio V (posdesove). Sin embargo, los niveles promedio detectados de E_2 y $17-P_4$ en las hembras con estado ovárico similar al del estadio I fueron de 1.9 ± 1.4 ng/mL y 1.9 ± 0.5 ng/mL,

respectivamente. Estos valores disminuyeron a 1.5 ± 0.6 ng/mL de E_2 y 1.3 ± 0.5 ng/mL de $17-P_4$ en hembras con un estadio similar al de la etapa II, e incrementando de nuevo en las hembras con estado similar al estadio III (1.9 ± 0.0 ng/mL de E_2 y 1.6 ± 0.0 ng/mL de $17-P_4$). No se detectó diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre los valores de niveles hormonales comparando hembras con estados similares de desarrollo entre ambas temporadas.

En la Figura 4 se contrasta la composición folicular de los cuatro estadios de maduración descritos durante la época de desoves, asociados con los niveles circulantes de E_2 y $17-P_4$. Las hembras inmaduras en el estadio I mostraron exclusivamente folículos previtelinos, principalmente folículos primarios y secundarios (40% y 43%, respectivamente), los cuales se asocian con niveles hormonales mayores a 2 ng/mL de ambas hormonas. Las hembras con gónadas en el estadio II muestran un elevado número de folículos previtelinos y aparecen los primeros vitelinos y maduros (7% y 3%, respectivamente); estas condiciones acompañaron un descenso en los niveles hormonales. Las hembras en el estadio III se caracterizaron por la presencia de folículos primarios (42%), un aumento en el porcentaje de folículos vitelinos y maduros (15% y 6 %, respectivamente), acorde con el incremento en los niveles hormonales observados (E_2 y $17-P_4$). Las hembras con gónadas en el estadio IV presentaron folículos en todos los estadios, con presencia significativa de folículos vitelinos y maduros (21% y 11%), lo cual coincidió con los niveles elevados de hormonas, particularmente de E_2 .

Discusión

La época reproductiva del pez blanco es amplia y varía dependiendo del hábitat y de la especie.^{14,15,17} Los estudios de biología pesquera con *C. humboldtianum* indican que la época reproductiva en poblaciones silvestres es de seis meses, con algunos meses de intensa actividad, mientras que para otras especies de "peces blancos" se registran dos épocas de desoves.¹⁵ Los datos encontrados con estos peces en cautiverio en los últimos cuatro años mostraron que la temporada reproductiva está representada sólo por una época de desoves durante el año, la cual da inicio en los primeros meses del propio año (con incremento gradual de temperatura y fotoperiodo) y se extiende hasta julio y agosto; en ella, la hembra tiene varios desoves y gran desgaste metabólico.^{14,17} Como se indica en la Figura 1, durante la temporada reproductiva, las hembras de mayor edad y tamaño

tuvieron constante actividad, mientras que las de menor edad inician sus desoves cuando el resto de la población la disminuye.

La edad de primera reproducción en estas especies también varía de acuerdo con el hábitat y con las condiciones ambientales.^{14,15} Los informes en ese sentido mencionan que las hembras alcanzan la madurez sexual cuando presentan intervalo de longitud total de 81 a 130 mm.²⁹ En este estudio se encontró que las hembras inician su reproducción al alcanzar, en promedio, 133.9 ± 2.3 mm de talla, que corresponde a un año de edad.

En este estudio el proceso de la primera maduración sexual de las hembras se observó a través del desarrollo y crecimiento de sus ovarios. En la época reproductiva, el IG fue el parámetro que permitió caracterizar cada estadio de maduración ovárica. Tyler y Sumpter¹⁹ mencionan que el IG en peces teleósteos con desoves sincrónicos alcanza valores hasta de 40, mientras que en las especies desovadoras asincrónicas este valor es cercano a 14. En *C. humboldtianum* se obtuvieron valores de IG cercanos a 8, menores al valor que la incluiría dentro del grupo de desovadores asincrónicos.

Se conoce que los peces hembras pueden incrementar su peso corporal hasta 90% a causa de la acumulación de la vitelogenina en sus ovocitos,^{19,23,30,31} muchos aspectos pueden ser explicados de acuerdo con los resultados de Zou *et al.*³² y Kwon,³³ quienes mencionan que la síntesis de la vitelogenina por los hepatocitos pudiera estar directamente influida por una estimulación recíproca entre somatotropina y prolactina. De acuerdo con lo anterior, en este estudio se observó que las hembras de mayor talla mostraron intensa actividad reproductiva y una relación lineal directa entre el IG con el peso corporal. Por lo contrario, en la temporada de descanso reproductivo, el IG no mostró un patrón definido, presentando valores menores a 5 y una relación no lineal con el PC. En lo que respecta al IH, en éste no existió una relación directa con el peso de la hembra.

Las hembras de *C. humboldtianum* mostraron folículos previtelinos y vitelinos durante los diferentes estadios de desarrollo ovárico. Lo anterior explica la estrategia reproductiva de la especie, y coincide con otros informes histológicos.^{29,34} Sin embargo, a diferencia de otros estudios, la clasificación de los estadios de maduración gonadal propuesta en esta investigación (Cuadro 1), se encuentra respaldada por las observaciones histológicas y muestra el proceso gradual de la primera madurez gonadal. El constante reclutamiento de los folículos primarios (Cuadro 2) indica la presencia de "bancos de ovogonias" durante todo el periodo de vida sexual, característica propia de los

peces teleósteos y de algunos anfibios.³⁵ Los desoves constantes indican presencia de hembras con distinta composición folicular a lo largo de la temporada reproductiva, en virtud de que al ser liberados los ovocitos maduros, otros folículos continúan con el proceso de ovogénesis, que es característico de los desovadores de tipo sincrónico por grupos.¹⁹ De acuerdo con los datos histológicos y patrón de desoves, la descripción que hace Pankhurst³⁶ de esta especie debe ser considerada como sincrónica por grupos múltiples, a pesar de los valores de IG presentados en este estudio. Por lo tanto, para definir el patrón del modelo reproductivo y desarrollo ovárico, se sugiere emplear necesariamente un análisis histológico y no únicamente basarse en el IG.

En contraste, en la época de recuperación sexual, las hembras muestran gónadas posdesove o recrudescientes (estadio V), que permanecieron en el mismo estadio de desarrollo que tenían cuando terminó la temporada reproductiva. Estas observaciones pudieran indicar que los ovarios detienen su proceso de ovogénesis, conservan su población folicular y muy probablemente su capacidad esteroidogénica. Lo anterior está basado en los recientes hallazgos, en la que se muestra que esta especie detiene su actividad reproductiva cuando las condiciones ambientales (fotoperiodo y temperatura) son igualadas artificialmente a las de la época de descanso sexual, y reanudan con sus desoves si las condiciones ambientales nuevamente se tornan favorables.¹⁴

Los niveles hormonales de E_2 y de la $17-P_4$ encontrados en *C. humboldtianum*, parecen apoyar lo anterior. Al comparar a las hembras con estados similares de desarrollo ovárico, entre la época de desoves y la de descanso reproductivo; se encontró, al igual que con la composición folicular, que los niveles hormonales eran similares para ambas temporadas (ANDEVA $P < 0.05$), lo que sugiere que en la temporada de no desoves, los ovarios mantienen su capacidad esteroidogénica, la cual es sostenida por su población folicular. Sin embargo, las hembras no alcanzan su máximo estado de madurez, debido probablemente al gran gasto metabólico que les infringió la temporada de desoves y los cambios en las condiciones ambientales naturales de temperatura y fotoperiodo. Por lo tanto, el seguimiento de los niveles hormonales desde etapas juveniles hasta el final de su vida reproductiva pudiera ser un campo muy interesante para futuras investigaciones.

Los niveles hormonales encontrados en este estudio indican actividad esteroidogénica temprana (estadio I), que difiere de otros hallazgos, en los cuales se sostiene que la máxima capacidad esteroidogénica que se debe a las capas foliculares

bien desarrolladas, propias de folículos vitelinos y maduros que caracterizan a las gónadas maduras.^{8-10,37,38}

Diversas evidencias en el campo de la endocrinología en peces enfatizan el papel que desempeñan las células de la teca en la síntesis de la 17-P₄, y la subsiguiente participación de las células de la granulosa para transformarla en 17,20β-P₄, y en 17,20β, 21-P₄; mientras que por otra vía metabólica, en las células de la granulosa es transformada la 17-P₄ a E₂ vía testosterona.^{10,37,38} En este estudio, la población folicular para las hembras en el estadio I, estuvo caracterizada por la ausencia de folículos vitelinos y maduros, así como por la presencia de folículos primarios y secundarios, que no muestran desarrollo completo de sus paredes foliculares; sin embargo, sí presentan niveles hormonales significativos.

Los estudios de Nakamura y Nagahama³⁹ en algunos cíclidos y especies de salmónidos, coinciden con lo aquí notificado; estos investigadores siguieron una actividad hormonal temprana como requisito necesario para iniciar el proceso de diferenciación gonadal y, además, mostraron que las células productoras de esteroides aparecen inicialmente al mismo tiempo que ocurre la diferenciación gonadal en tilapia (*Oreochromis niloticus*) y salmón (*Oncorhynchus rhodurus*). Asimismo, con ayuda de procedimientos inmunohistoquímicos, ha sido evidente la actividad aromatizante en células productoras de esteroides en ovarios inmaduros de *Oreochromis niloticus*.⁵ Recientemente, Grier⁴⁰ informa que desde el inicio de la ovogénesis, las ovogonias que están aún en el epitelio germinal, ya se encuentran rodeadas de células prefoliculares visibles sólo por microscopía electrónica. Estas evidencias pudieran explicar los niveles encontrados en gónadas inmaduras en la presente investigación, y apoyar la tesis de una temprana actividad aromatizante en las incipientes estructuras foliculares. Recientemente, para una especie neotropical mexicana (*Petenia splendida*), Pérez⁴¹ informa sobre la presencia de niveles significativos de estradiol en hembras en cuyos ovarios también se presentan principalmente folículos previtelinos. Asimismo, existen evidencias en la producción o conversión extragonadal de hormonas esteroides en células del cerebro, lo cual implica un importante papel en el control de desarrollo gonadal,⁴² situación que sugiere una interrogante posterior al proceso de diferenciación sexual; ¿En qué momento inicia la síntesis de los esteroides gonadales en los “peces blancos”?

La disminución de los niveles hormonales circulantes observada en hembras con ovarios en el estadio II, en los cuales se aprecian algunos ovocitos vitelinos y maduros,

indica la posible influencia reguladora que tienen los niveles hormonales circulantes a nivel del hipotálamo y de la hipófisis, los cuales posiblemente inhiben la liberación GnRH y de las gonadotropinas, y por lo tanto, su consecuente acción a nivel gonadal. Van Oordt y Goos⁴³ mencionan que bajas concentraciones de hormonas en la sangre son suficientes para la producción y mantenimiento de ovocitos vitelogénicos, pero no suficientes para la ovulación y maduración espontánea. Este control endocrino coincide con los resultados obtenidos en este estudio para esta especie de pez blanco.

Este artículo constituye la primera contribución al conocimiento del proceso anatómico-funcional de las gónadas en hembras de Pez Blanco (*C. humboldtianum*) durante su primer ciclo reproductivo, y sustenta la hipótesis de una temprana actividad en la síntesis de esteroides gonadales, así como el mantenimiento de su capacidad esteroidogénica durante la época de no desoves, que se apoya en la población folicular como preámbulo a la próxima temporada reproductiva, o a un estímulo ambiental favorable para la reproducción.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Gabriela López y a Erica Gómez López su ayuda en el trabajo endocrinológico, y a Xóchitl Guzmán García por su apoyo en el proceso histológico. El primer autor agradece la beca que tuvo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, de México, con matrícula 153056.

Referencias

1. Munro AD. General introduction. In: Munro AD, Scott AD, Lam TJ, editors. Reproductive seasonality in Teleosts environmental influences. Boca Raton Florida: CRC Press, 1990:1-11.
2. Redding JM, Patiño R. Reproductive physiology. In: Evans DH, editor. The physiology of fishes. Boca Raton Florida: CRC Press, 1993:503-534.
3. Young G, Kagawa H, Nagahama Y. Secretion of aromatizable Δ^4 androgens by thecal layers during estradiol-17 β production by ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) *in vitro*. Biom Res 1982; 3:659-667.

4. Kagama H, Young G, Nagahama Y. *In vitro* estradiol-17 beta and testosterone production by ovarian follicles of the goldfish, *Carassius auratus*. Gen Comp Endocrinol 1984; 54:139-143.
5. Kobayashi M, Aida K, Hanya U. Hormone changes during the ovulatory cycle in goldfish. Gen Comp Endocrinol 1988; 69:301-339.
6. Smith JS, Thomas P. Binding characteristics of the hepatic estrogen receptor of the spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*. Gen Comp Endocrinol 1990; 77:29-42.
7. Yoshikuni M, Nagahama Y. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. Bull Inst Zool Acad Sin Mon 1991; 16:139-172.
8. Nagahama Y. 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one a maturation-inducing hormone in fish oocytes: Mechanisms of synthesis and action. Steroids 1997; 62:190-196.
9. Devlin HR, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture 2002; 208:191-364.
10. Nagahama Y. Endocrine control of oocyte maturation. In: Norris DO, Jones RE, editors. Hormones and reproduction in fishes, amphibians and reptile. New York: Plenum, 1987:171-201.
11. Swanson P, Suzuki K, Kawauchi H, Dickhoff WW. Isolation and characterization of two Coho salmon gonadotropins GTH I and GTH II. Biol Reprod 1991; 44, 29-38.
12. Thomas, P. Hormonal control of final oocyte maturation in sciaenid fishes. In: Davey KG, Peter RE, Tobe SS, editors. Perspectives in comparative Endocrinology. Ottawa Canada: National Research Council of Canada, 1994:619-625.
13. Patiño R. Manipulations of the reproductive system of fishes by means of exogenous chemicals. Prog Fish-Cult 1997; 59:118-128.
14. Blancas-Arroyo G, Figueroa-Lucero G, Barriga-Sosa I, Arredondo-Figueroa JL. Effects of an artificial photothermal cycle on the reproduction of shortfin silverside, *Chirostoma humboldtianum*, Valenciennes, 1835 (Pisces: Atherinopsidae). Aquaculture 2004; 241: 575-585.
15. Paulo MP, Figueroa LG, Soria BM. Peces dulceacuicolas mexicanos XIX *Chirostoma humboldtianum* (Atheriniformes: Atherinopsidae). Zool Inf 2000;3:59-74.
16. Mares BG, Morales PJJ. Contribución al estudio del cultivo de pescado blanco *Chirostoma estor estor* en el centro Regional de Investigación Pesquera de

- Pátzcuaro, Michoacán. In: Rojas CP, Fuentes CD, editors. Historia y avances del cultivo de pescado blanco. México DF; Instituto Nacional de la Pesca, 2003:43-154.
17. Blancas-Arroyo G, Figueroa-Lucero G, Barriga-Sosa I, Arredondo-Figueroa JL. Primeras experiencias sobre el manejo de reproductores de Pez Blanco (*Chirostoma humboldtianum* Valenciennes, 1935) bajo condiciones controladas. Memorias del II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura CIVA 2003; 2003 agosto-febrero 2004; Universidad de Zaragoza, España: Universidad de Zaragoza, Agosto 2003:30-42. Disponible en: <http://www.revistaaquatic.com/civa2003/coms/listado.asp?cod=38>
18. Rodríguez GM. Técnicas de evaluación cuantitativa de la madurez gonádica en peces. México DF: AGT, 1992.
19. Tyler CR, Sumpter, LP. Oocyte growth and development in teleosts. Rev Fish Biol Fisheries 1996; 6:287-318.
20. Solórzano PA. Contribución al conocimiento de la biología del charal prieto (*Chirostoma bartoni*, Jordán y Evermann, 1896) del lago de Pátzcuaro, Michoacán. México DF: Secretaría de Pesca, 1961.
21. Uria GE, Moncayo LME, Garibay GR. Desarrollo y madurez testicular del charal *Chirostoma humboldtianum* (Pisces: Atherinidae), del embalse Huapango, estado de México. Hidrobiologica 1998; 8(Suppl 1):9-18.
22. Lee GL. Manual of histological staining methods of Armed Forces Institute of Pathology. 3rd ed. New York; McGraw-Hill Book Co, 1974.
23. Wallace RA, Selman K. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. J Electron Microsc Techn 1990; 16:175-201.
24. Herrera DMR, Luna MM, Romero RC. Obtención de anticuerpos con la progesterona y estradiól, estandarización del radioinmunoanálisis y validación en sueros de ruminantes. Vet Méx 1993; 24:223-230.
25. Carolsfeld J, Scott AP, Collins PM, Sherwood NM. Reproductive steroids during maturation in a primitive Teleost, the Pacific Herring (*Clupea harengus pallasii*). Gen Comp Endocrinol 1996; 103:331-348.
26. Zar JH. Biostatistical Analysis. New Jersey USA: Prentice-Hall Englewood Cliffs, 1999.
27. StataCorp. Stata statistical software (computer program); Release 8.0., Texas (USA): College Station, 2003.

28. Salgado-Ugarte IH. El análisis exploratorio de datos biológicos. Fundamentos y aplicaciones. México DF: Facultad de Estudios Superiores- Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, 1992.
29. Cárdenas RR. Cultivo de pez blanco *Chirostoma humboldtianum*. Consideraciones para su producción. In: Rojas CP, Fuentes CD, editores. Historia y avances del cultivo de pescado blanco. México DF; Instituto Nacional de la Pesca, 2003:191-210.
30. Tyler CR. Vitellogenesis in salmonids. In: Scott AP, Sumpter JP, Kime DE, Rolfe L, editors. Reproductive Physiology of Fish. United Kingdom England: Sheffield University Press, 1991:295-299.
31. Carnevali O, Mosconi G, Cambi A, Ridolfi S, Zanuy S, Polzonetti-Magni AM. Changes of lysosomal enzyme activities in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) eggs and developing embryos. Aquaculture 2001; 202:249-256.
32. Zou JJ, Trudeau VL, Cui Z, Brechin J, Mackenzie K, Zhu Z, *et al*. Estradiol stimulates growth hormone production in female goldfish. Gen Comp Endocrinol 1997; 106:102-112.
33. Kwon HC. Effects of estradiol and pituitary hormones on *in vitro* vitellogenin synthesis in the eel, *Anguilla japonica*. J Korean Fish Soc 1997;30:282-290.
34. Moncayo ER, Escalona GC, Segura GV. Los peces blancos del Lago de Chapala. Características Generales. In: Rojas CP, Fuentes CD, editores. Historia y avances del cultivo de pescado blanco. México DF; Instituto Nacional de la Pesca, 2003:51-78.
35. Tokarz RR. Oogonial proliferation, oogenesis, and folliculogenesis in onmammalian vertebrates. In: Takashima F, Hibiya T, editors. An atlas of fish histology. Normal and pathological features. Tokyo Japan: Gustav Fischer Verlag 1978.
36. Pankhurst NW. Reproduction. In: Black KD and Pickering AD, editors. Biology of Farmed Fish. Florida USA: Sheffield Academic Press, 1998:1-18.
37. Fostier A, Jalabert B, Billard R, Breton B, Zohar Y. The gonadal steroids. In: Hoar AWS, Randall DJ, Donaldson EM, editors. Fish Physiology. Orlando Florida: Academic Press, 1983:277-372.
38. Lee WK, Yang SW. Relationship between ovarian development and serum levels of gonadal steroid hormones, and induction of oocyte maturation and ovulation in the

- cultured females Korean spotted sea bass *Lateolabrax maculatus* (Jeom-nong-eo). Aquaculture 2002; 207:169-183.
39. Nakamura M, Nagahama Y. Ultrastructural study on the differentiation and development of steroid-producing cells during ovarian differentiation in the amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*. Aquaculture 1993; 112:237-251.
40. Grier H. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the Common Snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). J Morphol 2000; 243:265-281.
41. Pérez VMH. Estudio histológico y endocrino de los ciclidos Neotropicales, Tenguayaca, *Petenia splendida* y la Mojarra Pinta, *Parachromis* (*Cichlasoma*) *managuensis* del Sudeste de México (tesis doctoral). México (D F): Universidad Autónoma Metropolitana, 2006.
42. Callard GV, Manz L, Petro Z, Claiborne JB. Brain estrogen biosynthesis and estrogen conjugating system in the sculpin (myoxocephalus). Bull Mount Desert Island Biol Lab 1982; 22:41-43.
43. Van Oordt PGWJ, Goos HJTH. The African catfish, *Clarias gariepinus*, a model for the study of reproductive endocrinology in Teleosts. Aquaculture 1987; 63:15-26.

Association between ovarian development and serum concentrations of 17β -estradiol and 17α -hydroxy-4-pregnen-3-one in first maturation females of the shortfin silverside fish, *Chirostoma humboldtianum* (Atheriniformes: Atherinopsidae)

Introduction

Reproduction in teleostean fish is controlled by endogenous biological rhythms,¹ as in all vertebrates, being this a process that demands a physiological coordination, which is regulated by the hypothalamus-pituitary-gonadal axis and stimulated by environmental factors, such as photoperiod and temperature.² Association among gonadal development and serum levels of steroid hormones have proved to be an important tool to understand the endocrinal control in fish reproduction. It is known that in teleostean female fish, vitellogenesis and follicular maturation are regulated by GtH I and GtH II gonadotropins through out steroid hormones secreted by follicular cells surrounding the oocyte. Since maturation is induced by C21 steroids, such as $17,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ($17,20\beta$ -P₄) and $17,20\beta,21$ -trihydroxy-4-pregnen-3-one ($17,20\beta,21$ -P₄), these are called as maturation-induction hormones (MIH).³⁻⁹ Circulating estradiol influences the positive and negative regulation of the gonadotropin secretion by the pituitary gland and on the synthesis and the hypothalamic release of the gonadotropin release hormone (GnRH).

Circulating E₂ levels decrease after ovarian growth and oocyte development are complete in the teleostean female fish. There is an increase in gonadotropin II (GtH II) that indices the steroidogenic process, synthesis and release of the MIH, when the female is ready for spawning.^{2,10-13}

The shortfin silverside belongs to the *Chirostoma* genus; they are endemic from the Central Mexico Plateau, where they support ancestral fishing. The shortfin silverside *C. humboldtianum* species has a wide reproductive season with multiple spawnings under natural conditions.^{14,15} However, knowledge about their reproductive biology is scarce, especially relating to female fish. Knowledge about this process is necessary for reproduction control, particularly for those species which present culture problems, such as the shortfin silverside.¹⁴

The first reproductive cycle of the *C. humboldtianum* female under culture conditions, ovarian maturation stages and changes in the follicular composition associated

to circulating levels of 17β -estradiol (E_2) and 17α -hydroxy-4-pregnen-3-one ($17-P_4$) during spawning and reproductive rest seasons are presented here.

Material and methods

Reproductive fish

C. humboldtianum reproductive fish were initially caught from a wild population in "Las Tazas" dike, Jocotitlan Municipality, State of Mexico, Mexico. Fish were kept under culture conditions in the Aquaculture Experimental Building facilities (PEXPA), supplied by the Metropolitan Autonomous University – Iztapalapa Campus (UAM-I). The studied population (F1) was formed without regarding sex of fish ($n = 226$). Individuals were divided into three groups according to age: group 1, 10 months $n = 158$ and mean total length (TL) and weight (TW) of 94.2 ± 1.6 mm and 6.6 ± 1.6 g, respectively; group 2, 11 months, $n = 42$, TL and TW of 116.8 ± 0.5 mm and 11.5 ± 1.9 g, respectively; group 3, 12 months, $n = 26$, TL and TW of 133.9 ± 2.3 mm and 19.6 ± 6.9 g, respectively. Each group was cultured separately in 4,000 L ponds. Each pond had a closed recirculation system, water quality and feeding strategies were as recommended by Mares and Morales¹⁶ and Blancas *et al.*^{14,17} Sex of all fish was manually determined.

Ovarian development

Fifty female fish were caught from all the groups (30 in the reproductive season and 20 during the resting season). Ovarian-development study started with 10, 11 and 12-month-old fish. Females were anesthetized using benzocaine diluted with 1.6 % ethylic alcohol; TL and TW were recorded using an ictiometer graduated by millimeters, and a digital balance* with 0.1 g accuracy, respectively. Ovarian color and appearance were recorded as well. Visceral space percentage (VSP) occupied by ovaries was assessed through out the volumetric method.¹⁸ Using these values, gonadosomatic (GI) and hepatosomatic (HI) indexes were calculated, according to Tyler and Sumpter.¹⁹ Ovarian maturity stages were characterized in agreement with Solorzano,²⁰ who reported a classification for fish of the same genus.

* OHAUS, GT 4800 model, United States of America.

Follicular composition

Histological analysis was described for the 50 ovarian pairs, conserved in Bouin solution;²¹ then dehydration, clearance, perfusion and paraffin-imbibitions² (49 to 50°C fusion pint) were performed. Transversal, 8 μ depth cuts were done using a Microm microtome.² After that, paraffin was removed from the histological sections, dyed with Harris hematoxylin – yellowish Eosin (H-E) and finally conserved in Merk resin.²²

Histological sections were observed using a light microscope in order to do the ovarian description.³ Identification and quantification of the different stages of follicular development were done according to Wallace and Selman.²³ The following stages were identified: a) nuclear chromatin = primary follicles (PF); b) perinuclear = secondary follicles (SF); c) cortical alveolus = tertiary follicles (TF); d) vitellogenic stage = vitelline follicles (VF), and e) maturation stage = mature follicles (MF). Five histological preparations of the ovaries in maturation stage I, nine in stage II, 14 in stage III and 12 in stage IV were needed to know the follicular characteristics of each ovarian maturation-stage. For this, 100 follicles were identified and counted for each developmental stage.

Steroid hormones

Thirty-five serum samples were analyzed; nine of these were a mixture of samples from several females in the same ovarian maturity stage and follicular composition because of the scarce volume collected. Steroid hormones were assessed by the radioimmunoanalysis technique (RIA), based on Herrera *et al.*²⁴ and Carolsfeld *et al.*²⁵ methodological principles, using H³ and highly specific antibodies. Blood was collected by cardiac puncture and serum was obtained by centrifugation (15 min at 805 g and 4°C). Serum samples were purified using filters³ and 80% recovery was achieved for each steroid. Each purified serum sample was recovered in two fractions: one with ethanol and the other with distilled water; alcohol was evaporated and later the two fractions were united (1 mL). Finally, serum was diluted at a final volume of 2 mL with Gel-PBS (0.2 M, 17.6 g of NaCl and 2.0 g of gelatin/L). Standard curves were sensitized to 5 pg/mL. Duplicated 400 μ L aliquots were taken to evaluate E₂ and 17-P₄ separately by RIA. Analysis was done according to each ovarian maturation stage and follicular composition for both seasons.

² Model HM 315, Leica, Walldorf, Germany.

Statistical analysis

Data base was captured using Excel software. A correlation analysis (CA) was done to verify GI and HI correspondences regarding female total weight in the reproductive and resting seasons.²⁶ A data exploratory analysis (DEA) with box plots was used²⁷ in order to assess hormone level behaviors between each other and during both seasons.²⁸ A non-parametric, one way ANOVA test was used to determine significant differences among the hormonal levels found according to each developmental stage.

Results

First female reproductive season

The whole population (the three groups) showed a reproductive season of six months (from January 28th to August 15th, 2003). Reproductive season started with the one-year-old females, group 3 (Figure 1); meanwhile, females in group 2 started at 11 months and three weeks of age. Females in group 1 had their first spawning stages until they were one-year-old.

The number of spawning stages per group pointed out a significant participation of females older than one year of age, which corresponded to groups 2 and 3, with 33 and 32 spawns, respectively; younger females had a total of 12 spawnings. During the reproductive season, Group 3 presented a six-week pause without spawning (from May 10th to July 2nd). Females in group 2 were characterized by showing a continuous activity and those in group 1 had a discrete but constant activity (less than two spawnings).

Ovarian development

It was possible to differentiate four gonadal maturation-stages (I, II, III, IV), according to GI results, VSP occupied by ovaries and sexual activity (spawning), during the reproductive season, and one more stage during the sexual resting season (V) (Table 1). However, the last stage was characterized by ovaries with GI and VSP values similar to those in stages I to III of the reproductive season.

Maximum and minimum GI and HI values during the reproductive season were 0.2 to 7.1 and 0.9 to 2.9, respectively, and values during the non-reproductive season were 0.3 to 3.5 and 1.2 to 22.2, respectively. Both indexes showed a positive relation with body

weight during the reproductive season in the CA ($r^2 = 0.74$, $P \leq 0.05$ and $r^2 = 0.89$, $P \leq 0.05$, for GI and HI, respectively), but not during the resting season ($r^2 = 0.3$, $P \leq 0.05$ and $r^2 = 0.17$, $P \leq 0.05$).

Follicular composition

Histological analysis showed that gonads in the shortfin silverside females had follicles in all of the developmental stages, pre-vitelline (PF, SF and TF) as well as vitelline (VF and MF). Changes in the percentages of the different follicles were seen during the spawning season, which reflected a reproductive activity. Immature ovaries were characterized by the dominance of primary and secondary follicles, and the number of mature vitelline follicles was increased, in all of the ovarian maturation stages without a defined pattern, as the ovarian maturation process continued. Recruitment of primary follicles was present in all the ovarian maturation stages (II to V) (Figure 2). A similar follicular composition was recorded during the resting season; the only difference was that during this period there were no females with ovaries well developed (stage V). Only 13 of the 30 females analyzed during the spawning season presented an ovarian maturation stage I; seven in stage II; four in stage III and six in stage IV. While during the non-spawning season, the 20 females analyzed were in the ovarian maturation stage V (Table 2).

Sexual steroid hormones

Circulating levels of the E_2 and $17-P_4$ steroid hormones detected in the shortfin silverside females, varied between 0.56 to 9.68 ng/mL and 0.53 to 2.55 ng/mL, respectively (Figure 3), depicts the mean hormonal levels, grouped according to ovarian maturation stages. Important circulating levels were observed in immature females (stage I) during the spawning season, reaching 2.5 ± 0.7 ng/mL of E_2 and 2.4 ± 0.3 ng/mL of $17-P_4$. Hormonal levels during stage II were 1.7 ± 0.2 ng/mL of E_2 and 0.9 ± 0.2 ng/mL of $17-P_4$ an increase was seen again in stage III with 2.8 ± 0.6 ng/mL levels of E_2 and 1.4 ± 0.5 ng/mL of $17-P_4$. High E_2 levels were detected in stage IV (7.5 ± 2.1 ng/mL), while $17-P_4$ levels were similar to those in stage II (1.8 ± 0.9 ng/mL).

During the non-reproductive season, ovaries were in stage V (pre-spawning). However, mean de E_2 and $17-P_4$ levels detected in females with an ovarian stage similar to stage I were 1.9 ± 1.4 ng/mL and 1.9 ± 0.5 ng/mL, respectively. These values decreased

to 1.5 ± 0.6 ng/mL of E_2 and 1.3 ± 0.5 ng/mL of $17-P_4$ in females with a stage similar to that in stage II, and increased again in females with a stage similar to stage III (1.9 ± 0.0 ng/mL of E_2 and 1.6 ± 0.0 ng/mL of $17-P_4$). No significant difference was detected ($P \leq 0.05$) among hormonal levels when females with similar developmental stages were compared between seasons.

The follicular compositions of the four maturation stages described during the spawning season are contrasted, associated to the circulating E_2 and $17-P_4$ levels in figure 4. Mature females in stage I exclusively showed pre-vitelline follicles, mainly primary and secondary ones (40% and 43%, respectively), which were related to hormonal levels higher than 2 ng/mL for both hormones. Females with gonads in stage II showed a high number of pre-vitelline follicles and the first vitelline and mature ones appeared (7% and 3%, respectively), along with a decrease in hormonal levels. Females in stage III were characterized by the presence of primary follicles (42%), increase in vitelline and mature ones (15% and 6%, respectively), according to the increased hormonal levels observed (E_2 and $17-P_4$). Finally, females in stage IV showed follicles in all stages, with a significant presence of vitelline and mature ones (21% and 11%), which agreed with the high hormonal levels, especially E_2 .

Discussion

Reproductive season in the shortfin silverside fish is wide and varies depending on the habitat and species.^{14,15,17} Studies on *C. humboldtianum* fishing biology point out that the reproductive season in wild populations lasts six months, with some months of intense activity; while tow spawning seasons are recorded in other shortfin silverside species.¹⁵ Data found on this fish under captivity conditions during the last four years, showed that the reproductive season includes only one spawning season along the year. This season starts during the first months of the year (with a gradual temperature and photoperiod increase) and prolongs until July and August. During this time, the females have several spawnings and a huge metabolic waste.^{14,17} Older and bigger females had a constant activity through out the reproductive season, while the younger ones started spawning when the rest of the population had a decreased activity (Figure 1).

In these species, age of first reproduction also varies according to habitat and environmental conditions.^{14,15} Reports regarding the issue mention that females reach sexual maturity when an 81 to 130 mm total length is achieved.²⁹ It was found in this study

that the mean length in which females start reproducing is 133.9 ± 2.3 mm, that corresponds to one-year-old fish.

The process of the first sexual maturity in females was observed through out ovarian development and growth in this study. GI was the parameter that allowed the characterization of each ovarian maturation stage during the reproductive season. Tyler and Sumpter¹⁹ mention that GI in teleostean fish with synchronic spawning, reaches values up to 40, while for species with a non-synchronic spawning, GI value is close to 14. In *C. humboldtianum* GI values were close to 8, lower to the one that would be necessary to be included in the non-synchronous group.

It is known that female fish can increase their body weight up to 90% because of the vitellogenic accumulation in their oocytes.^{19,23,30,31} Many aspects can be explained based on Zou *et al.*³² and Kwon³³ results, who report that vitellogenic synthesis by hepatocytes might be directly influenced by a reciprocal stimulation between growth hormone and prolactin. According to this, it was observed in this study that bigger females showed an intense reproductive activity and a lineal-direct relation between GI and body weight. Contrary to this, GI did not show a defined pattern during the resting season, presenting values lower than 5 and a non-linear relation to BW. Regarding HI, it did not have a direct relation with female weight.

C. humboldtianum females showed pre-vitelline and vitelline follicles through out the different stages of ovarian development; which explains the reproductive strategy of this species and concurs with other histological reports.^{29,34} However, the classification of gonadal maturity proposed in this research (Table 1), is backed up by histological observations and shows the gradual process of the first gonadal maturity, in disagreement with other studies. Constant recruitment of primary follicles (Table 2) points out the presence of "oogonia banks" during all the period of sexual life; as it occurs in teleostean fish and some amphibians.³⁵ Constant spawning denotes the presence of females with different follicular composition along the reproductive season, due to the fact that, when mature oocytes are released, other follicles continue the oogenesis process, which is characteristic of multiple-group-synchronous fish.¹⁹ According to histological data and spawning pattern, the description done by Pankhurst³⁶ on this species should be considered as multiple-group-synchronous; despite the high GI values seen in this study. Therefore, in order to define the pattern of the reproductive model and ovarian

development, it is suggested that the use of a histological analysis is necessary, instead of basing it exclusively on GI:

In contrast, in the season of sexual recovery, females had post-spawning or intensified gonads (stage V), that remained in the same developmental stage that since the end of the reproductive season. These observations might point out those ovaries stop the oogenesis process, conserve their follicular population and probably, their steroidogenic capacity. Recent findings support the previous statement, showing that this species stops its reproductive activity when environmental conditions (photoperiod and temperature) are artificially matched to those of the season of sexual rest. Spawning starts again if environmental conditions turn to a favorable stage again.¹⁴

The hormonal levels (E_2 and $17-P_4$) found in *C. humboldtianum* seem to support the previous affirmation. It was found that hormonal levels, as well as follicular composition, were similar between the spawning and resting seasons when females with similar ovarian stages were compared (ANOVA $P < 0.05$). The previous information suggests that ovaries keep their steroidogenic capacity in the non-spawning season through out their follicular population. However, females does not reach the maximum maturity stage, because of the huge metabolic waste provoked by the spawning season and the changing conditions in natural environments regarding temperature and photoperiod. Therefore, following hormonal levels, since juvenile stages towards the end of their reproductive life, might be an interesting field for future investigations.

The hormonal levels found in this study mark out and early steroidogenic activity (stage I), which differs from other findings that postulate that the maximum steroidogenic capacity is caused by the well developed follicular layers, characteristic of the vitelline and mature follicles found in mature gonads.^{8-10,37,38}

Several evidences in fish endocrinology remark the roll of the teca cells in the $17-P_4$ synthesis and the following participation of the granulose cells to transform it into $17,20\beta-P_4$, and $17,20\beta, 21-P_4$, while $17-P_4$ is transformed to E_2 by the testosterone via through another metabolic way.^{10,37,38} Follicular population for females in stage I was characterized in this study by the absence of vitelline and mature follicles, as well as by the presence of primary and secondary ones, which do not show a complete development of the follicular walls; nonetheless, they do present significant hormonal levels.

Nakamura and Nagahama³⁹ studies on cichlids and salmonid species concur with the reported here. They suggest an early hormonal activity as a necessary requirement to

start the gonadal differentiation process, furthermore, they showed that steroid producing cells initially appear at the same time as gonadal differentiation occurs in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). The aromatizing activity in steroid producing cells in mature ovaries from *Oreochromis niloticus* has been evident by using immunohistochemical procedures.⁵ Recently, Grier⁴⁰ reported that oogonia that are still in the germinal epithelium, are already surrounded by pre-follicular cells, visible only by electronic microscopy since the beginning of the oogenesis. This kind of evidence may explain the levels found in immature gonads in the present study and support the theory of an early aromatizing activity in the incipient follicular structures. Pérez⁴¹ reported lately about the presence of significant estradiol levels in females which ovaries also showed mainly pre-vitelline follicles in a Neotropical Mexican species (*Petenia splendida*). Furthermore, there is evidence about the production or extra-gonadal conversion of steroid hormones in brain cells, what implies an important roll in the control of gonadal development.⁴² This situation suggests a question posterior to the sexual differentiation process: when does the gonadal steroid synthesis begins in the shortfin silverside fish?

The decrease in the hormonal circulating levels in females with ovaries in stage II, in which some vitelline and mature follicles are seen, points out the possible regulatory influence that circulating hormonal levels have on the hypothalamus and pituitary gland, which possible inhibit GnRH and gonadotropin release, and, therefore, their following action at the gonadal level. Van Oordt and Goos⁴³ mention that low blood hormone concentrations are enough for the production and maintenance of vitellogenic follicles, but they are not enough for ovulation and spontaneous maturation. This endocrine control agrees with the results obtained for the shortfin silverside species studied here.

This paper represents the first contribution to the gonadal anatomic-functional process in the shortfin silverside fish (*C. humboldtianum*) during its first reproductive cycle. It also supports the hypothesis of an early activity in the gonadal steroid synthesis, as well as the maintenance of the steroidogenic capacity along the non-spawning season, based on the follicular population as a previous stage to the next reproductive season, or to an environmental stimulus favorable for reproduction.

Acknowledgements

Authors thank Gabriela Lopez and Erica Gomez Lopez for the support in the endocrinal work, and Xochitl Guzman Garcia for helping in the histological process. The first author acknowledges the scholarship provided by the National Council for Science and Technology, of Mexico, matriculation 153056.

Referencias

1. Munro AD. General introduction. In: Munro AD, Scott AD, Lam TJ, editors. Reproductive seasonality in Teleosts environmental influences. Boca Raton Florida: CRC Press, 1990:1-11.
2. Redding JM, Patiño R. Reproductive physiology. In: Evans DH, editor. The physiology of fishes. Boca Raton Florida: CRC Press, 1993:503-534.
3. Young G, Kagawa H, Nagahama Y. Secretion of aromatizable Δ^4 androgens by thecal layers during estradiol-17 β production by ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) *in vitro*. *Biom Res* 1982; 3:659-667.
4. Kagawa H, Young G, Nagahama Y. *In vitro* estradiol-17 beta and testosterone production by ovarian follicles of the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol* 1984; 54:139-143.
5. Kobayashi M, Aida K, Hanya U. Hormone changes during the ovulatory cycle in goldfish. *Gen Comp Endocrinol* 1988; 69:301-339.
6. Smith JS, Thomas P. Binding characteristics of the hepatic estrogen receptor of the spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*. *Gen Comp Endocrinol* 1990; 77:29-42.
7. Yoshikuni M, Nagahama Y. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Bull Inst Zool Acad Sin Mon* 1991; 16:139-172.
8. Nagahama Y. 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one a maturation-inducing hormone in fish oocytes: Mechanisms of synthesis and action. *Steroids* 1997; 62:190-196.
9. Devlin HR, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 2002; 208:191-364.

10. Nagahama Y. Endocrine control of oocyte maturation. In: Norris DO, Jones RE, editors. Hormones and reproduction in fishes, amphibians and reptile. New York: Plenum, 1987:171-201.
11. Swanson P, Suzuki K, Kawauchi H, Dickhoff WW. Isolation and characterization of two Coho salmon gonadotropins GTH I and GTH II. Biol Reprod 1991; 44, 29-38.
12. Thomas, P. Hormonal control of final oocyte maturation in sciaenid fishes. In: Davey KG, Peter RE, Tobe SS, editors. Perspectives in comparative Endocrinology. Ottawa Canada: National Research Council of Canada, 1994:619-625.
13. Patiño R. Manipulations of the reproductive system of fishes by means of exogenous chemicals. Prog Fish-Cult 1997; 59:118-128.
14. Blancas-Arroyo G, Figueroa-Lucero G, Barriga-Sosa I, Arredondo-Figueroa JL. Effects of an artificial photothermal cycle on the reproduction of shortfin silverside, *Chirostoma humboldtianum*, Valenciennes, 1835 (Pisces: Atherinopsidae). Aquaculture 2004; 241: 575-585.
15. Paulo MP, Figueroa LG, Soria BM. Peces dulceacuícolas mexicanos XIX *Chirostoma humboldtianum* (Atheriniformes: Atherinopsidae). Zool Inf 2000;3:59-74.
16. Mares BG, Morales PJJ. Contribución al estudio del cultivo de pescado blanco *Chirostoma estor estor* en el centro Regional de Investigación Pesquera de Pátzcuaro, Michoacán. In: Rojas CP, Fuentes CD, editors. Historia y avances del cultivo de pescado blanco. México DF; Instituto Nacional de la Pesca, 2003:43-154.
17. Blancas-Arroyo G, Figueroa-Lucero G, Barriga-Sosa I, Arredondo-Figueroa JL. Primeras experiencias sobre el manejo de reproductores de Pez Blanco (*Chirostoma humboldtianum* Valenciennes, 1835) bajo condiciones controladas. Memorias del II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura CIVA 2003; 2003 agosto-febrero 2004; Universidad de Zaragoza, España: Universidad de Zaragoza, Agosto 2003:30-42. Disponible en: <http://www.revistaaquatic.com/civa2003/coms/listado.asp?cod=38>
18. Rodríguez GM. Técnicas de evaluación cuantitativa de la madurez gonádica en peces. México DF: AGT, 1992.
19. Tyler CR, Sumpter, LP. Oocyte growth and development in teleosts. Rev Fish Biol Fisheries 1996; 6:287-318.

20. Solórzano PA. Contribución al conocimiento de la biología del charal prieto (*Chirostoma bartoni*, Jordán y Evermann, 1896) del lago de Pátzcuaro, Michoacán. México DF: Secretaría de Pesca, 1961.
21. Uria GE, Moncayo LME, Garibay GR. Desarrollo y madurez testicular del charal *Chirostoma humboldtianum* (Pisces: Atherinidae), del embalse Huapango, estado de México. *Hidrobiologica* 1998; 8(Supl 1):9-18.
22. Lee GL. Manual of histological staining methods of Armed Forces Institute of Pathology. 3rd ed. New York; McGraw-Hill Book Co, 1974.
23. Wallace RA, Selman K. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *J Electron Microsc Techn* 1990; 16:175-201.
24. Herrera DMR, Luna MM, Romero RC. Obtención de anticuerpos con la progesterona y estradiól, estandarización del radioinmunoanálisis y validación en sueros de ruminantes. *Vet Méx* 1993; 24:223-230.
25. Carolsfeld J, Scott AP, Collins PM, Sherwood NM. Reproductive steroids during maturation in a primitive Teleost, the Pacific Herring (*Clupea harengus pallasii*). *Gen Comp Endocrinol* 1996; 103:331-348.
26. Zar JH. Biostatistical Analysis. New Jersey USA: Prentice-Hall Englewood Cliffs, 1999.
27. StataCorp. Stata statistical software (computer program); Release 8.0., Texas (USA): College Station, 2003.
28. Salgado-Ugarte IH. El análisis exploratorio de datos biológicos. Fundamentos y aplicaciones. México DF: Facultad de Estudios Superiores- Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, 1992.
29. Cárdenas RR. Cultivo de pez blanco *Chirostoma humboldtianum*. Consideraciones para su producción. In: Rojas CP, Fuentes CD, editores. Historia y avances del cultivo de pescado blanco. México DF; Instituto Nacional de la Pesca, 2003:191-210.
30. Tyler CR. Vitellogenesis in salmonids. In: Scott AP, Sumpter JP, Kime DE, Rolfe L, editors. Reproductive Physiology of Fish. United Kingdom England: Sheffield University Press, 1991:295-299.
31. Carnevali O, Mosconi G, Cambi A, Ridolfi S, Zanuy S, Polzonetti-Magni AM. Changes of lysosomal enzyme activities in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) eggs and developing embryos. *Aquaculture* 2001; 202:249-256.

32. Zou JJ, Trudeau VL, Cui Z, Brechin J, Mackenzie K, Zhu Z, *et al.* Estradiol stimulates growth hormone production in female goldfish. *Gen Comp Endocrinol* 1997; 106:102-112.
33. Kwon HC. Effects of estradiol and pituitary hormones on *in vitro* vitellogenin synthesis in the eel, *Anguilla japonica*. *J Korean Fish Soc* 1997;30:282-290.
34. Moncayo ER, Escalona GC, Segura GV. Los peces blancos del Lago de Chapala. Características Generales. In: Rojas CP, Fuentes CD, editores. Historia y avances del cultivo de pescado blanco. México DF; Instituto Nacional de la Pesca, 2003:51-78.
35. Tokarz RR. Oogonial proliferation, oogenesis, and folliculogenesis in onmammalian vertebrates. In: Takashima F, Hibiya T, editors. An atlas of fish histology. Normal and pathological features. Tokyo Japan: Gustav Fischer Verlag 1978.
36. Pankhurst NW. Reproduction. In: Black KD and Pickering AD, editors. Biology of Farmed Fish. Florida USA: Sheffield Academic Press, 1998:1-18.
37. Fostier A, Jalabert B, Billard R, Breton B, Zohar Y. The gonadal steroids. In: Hoar AWS, Randall DJ, Donaldson EM, editors. Fish Physiology. Orlando Florida: Academic Press, 1983:277-372.
38. Lee WK, Yang SW. Relationship between ovarian development and serum levels of gonadal steroid hormones, and induction of oocyte maturation and ovulation in the cultured females Korean spotted sea bass *Lateolabrax maculatus* (Jeom-nong-eo). *Aquaculture* 2002; 207:169-183.
39. Nakamura M, Nagahama Y. Ultrastructural study on the differentiation and development of steroid-producing cells during ovarian differentiation in the amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*. *Aquaculture* 1993; 112:237-251.
40. Grier H. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the Common Snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). *J Morphol* 2000; 243:265-281.
41. Pérez VMH. Estudio histológico y endocrino de los ciclidos Neotropicales, Tenguayaca, *Petenia splendida* y la Mojarra Pinta, *Parachromis* (*Cichlasoma*) *managuensis* del Sudeste de México (tesis doctoral). México (D F): Universidad Autónoma Metropolitana, 2006.

- 416 42. Callard GV, Manz L, Petro Z, Claiborne JB. Brain estrogen biosynthesis and
417 estrogen conjugating system in the sculpin (*myoxocephalus*). Bull Mount Desert
418 Island Biol Lab 1982; 22:41-43.
- 419 43. Van Oordt PGWJ, Goos HJTH. The African catfish, *Clarias gariepinus*, a model
420 for the study of reproductive endocrinology in Teleosts. Aquaculture 1987; 63:15-26.

TABLE 1

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF OVARIAN MATURATION STAGES IN THE
SHORTFIN SILVERSIDE *C. humboldtianum*

Stages	Ovarian morphological characteristics
I	Immature stage. Clear color gonads, thin, non-differentiated between testis or ovary, it occupies less than 10 % of the VSP, $GI \leq 1$.
II	Early maturation stage. Grey-color ovaries, visible follicles, ovaries occupy 30 % of the VSP, $1 < GI \leq 3$.
III	Ovarian growth stage. Dark ovaries, they occupy 50% of the VSP, $3 < GI \leq 5$
IV	Spawning stage. Dark and brilliant ovaries, thin ovary wall, ovaries occupy more than 80% of the VSP, $GI > 5$.
V	Post-spawning stage. Dark ovaries, flaccid and rugged consistency, variable GI and VSP values but lower than 5 to 50%, respectively.

VSP = Visceral Space Percentage, GI = Gonadosomatic Index.

TABLE 2.

MEAN VALUES AND STANDARD DEVIATION ($\pm$) OF THE PERCENTAGES OF EACH OVARIAN MATURATION STAGE DURING THE SPAWNING SEASON IN THE SHORTFIN SILVERSIDE *C. humboldtianum*

Stages	N	Percentages (%)				
		PF	SF	TF	VF	MF
I	13	40 $\pm$ 3.0	43 $\pm$ 4.0	16 $\pm$ 2.0	1 $\pm$ 0.3	0
II	7	32 $\pm$ 5.0	39 $\pm$ 2.0	19 $\pm$ 1.0	7 $\pm$ 1.0	3 $\pm$ 1.0
III	4	42 $\pm$ 7.0	22 $\pm$ 3.0	15 $\pm$ 2.0	15 $\pm$ 2.0	6 $\pm$ 1.0
IV	6	35 $\pm$ 4.0	19 $\pm$ 3.0	14 $\pm$ 3.0	21 $\pm$ 2.0	11 $\pm$ 2.0

N = sample size; PF= Primary Follicles; SF = Secondary Follicles; TF = Tertiary Follicles; VF = Vitellogenic Follicles; MF= Mature Follicles.

Figure caption

Figure 1. Spawning stages of each group during 2003.

Figure 2. Histological slides of the ovarian maturation stages observed in *C. humboldtianum* (H-E).

A). Stage I, immature (500X), Bar = 38μ: GE = Germinal epithelium, PF = Primary follicles; N = Nucleus; Nu = Nucleoli; SF = Secondary follicles; **B)** Stage II, early maturation (200X), Bar = 89μ: A = Athresia, VF = Vitellogenic follicles; **C)** Stage III, ovarian growth (32X), Bar = 600μ: OW = Ovarian wall, MF = Mature follicles; **D)** Stage IV, spawning (32X) Bar = 600μ: and **E)** Stage V, post-spawning (200X), Bar = 89μ.

Figure 3. Fluctuating levels of E₂ and 17-P₄ observed in each ovarian maturation stage during the spawning and resting seasons.

Figure 4. Frequency (%) of the follicular development stages and hormone concentration of E₂ and 17-P₄ in the different ovarian maturation stages. PF = Primary follicles; SF = Secondary follicles; TF = Tertiary follicles; VF = Vitellogenic follicles; MF = Mature follicles.

