



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**ESTUDIO DE LA REPRODUCCIÓN EN
CAUTIVERIO DE LA CABRILLA SARDINERA,
Mycteroperca rosacea: INDUCCIÓN HORMONAL AL
DESOVE, ESTEROIDES SEXUALES Y
DESCRIPCIÓN DEL DESARROLLO GONADAL EN
EL CICLO REPRODUCTIVO**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos
Naturales
(Orientación en Acuicultura)

p r e s e n t a

**Nilda Margarita Kiewek
Martínez**

La Paz, B.C.S. Septiembre de 2009

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11 horas del día 28 del Mes de Agosto del 2009, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Estudio de la reproducción en cautiverio de la cabrilla sardinera, *Mycteroperca rosacea*: Inducción hormonal al desove, esteroides sexuales y descripción del desarrollo gonadal en el ciclo reproductivo"

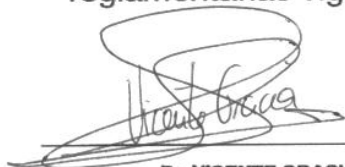
Presentada por el alumno:

Nilda Margarita Kiewek Martínez

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Acuicultura

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

LA COMISIÓN REVISORA



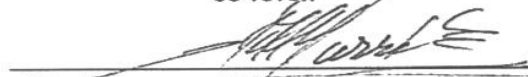
Dr. VICENTE GRACIA LÓPEZ
DIRECTOR DE TESIS




Dr. HUMBERTO VILLARREAL COLMENARES
CO-TUTOR



Dr. ANGEL CAMPA CÓRDOVA
CO-TUTOR



Dr. MANUEL CARRILLO ESTEVEZ
CO-TUTOR



Dr. SILVIA ZANUY DOSTE
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERRIERE ZARAGOZA
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMITÉ TUTORIAL Y REVISIÓN DE TESIS

Dr Vicente Gracia López
Director de Tesis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR)

Dr. Humberto Villarreal Colmenares
Asesor
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR)

Dr. Ángel Campa Córdoba
Asesor
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR)

Dr. Manuel Carrillo Estévez
Asesor
Instituto de Acuicultura Torre la Sal (IATS)

Dra. Silvia Zanuy Doste
Asesora
Instituto de Acuicultura Torre la Sal (IATS)

JURADO DE EXAMEN

Dr Vicente Gracia López
Director de Tesis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR)

Dr. Humberto Villarreal Colmenares
Asesor
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR)

Dr. Ángel Campa Córdoba
Asesor
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR)

Dr. Manuel Carrillo Estévez
Asesor
Instituto de Acuicultura Torre la Sal (IATS)

Dra. Silvia Zanuy Doste
Asesora
Instituto de Acuicultura Torre la Sal (IATS)

SUPLENTE

Dr. Roberto Civera Cerecedo (CIBNOR)
Dra. Danitzia Guerrero Tortolero (CIBNOR)

RESUMEN

La presente tesis aborda 3 objetivos principales de la reproducción de la cabrilla sardinera, *Mycteroperca rosacea* en cautiverio.

Se describió el periodo reproductivo a través del desarrollo gonadal con métodos histológicos. Las muestras de la gónada fueron obtenidas mensualmente por cateterización y los ovocitos de las muestras fueron clasificados en 5 categorías de desarrollo. Se obtuvo la frecuencia de éstos, con lo que se describió la distribución de los ovocitos dentro del ovario a lo largo de un ciclo reproductivo. Las hembras de la cabrilla sardinera mantenidas en cautiverio desarrollaron ovocitos en estadios de vitelogénesis avanzada a partir de marzo hasta junio donde podemos observar ovocitos atrésicos indicando el fin del periodo reproductivo. Dos individuos que fueron descritas como hembras en febrero, se encontraron en estadio bi-sexual en marzo y como machos en abril. El estado de transición se observó durante el periodo reproductivo e incluyó la degeneración de ovocitos primarios y la proliferación de espermatogonias.

En la segunda parte de la tesis se analizó el efecto de las hormonas Gonadotropina Coriónica Humana y el análogo de la Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante para inducir la Maduración Final del Ovocito evaluando la fecundidad, la tasa de fertilización y el número de huevos viables. Las hembras seleccionadas para el tratamiento hormonal fueron inyectadas con uno de los siguientes tratamientos: 1,500 IU Kg⁻¹ HCG, 15 µg Kg⁻¹ de LHRHa o 150 µg Kg⁻¹ de LHRHa. Durante el estudio, se indujo al desove a 38 hembras silvestres el mismo día de su captura y otras 59 hembras fueron mantenidas en cautiverio por lo menos diez meses antes de las pruebas de inducción. Se comprobó que las hembras inducidas a desovar con HCG produjeron el mayor número de huevos fertilizados y viables ($P < 0.05$) con una fecundidad total de $3-571 \times 10^3$ y la tasa de fertilización de 3-100%. El diámetro medio de los huevos fertilizados fue de $871 \pm 14 \mu\text{m}$. Se obtuvieron más de 9.5×10^6 huevos.

Finalmente, se cuantificó la concentración de esteroides sexuales comunes (E2, T, y 11-KT) contenidos en sangre de reproductores mantenidos en cautiverio durante un ciclo reproductivo y su relación con el grado de desarrollo gonadal. Los ovarios tuvieron un mayor porcentaje de ovocitos primarios durante el año. La tasa de ovulación fue mayor en junio y los niveles de E2 incrementaron en abril, la T no tuvo cambios significativos a excepción de julio durante el periodo de post-desove. Los niveles de 11-KT permanecieron sin cambios significativos a lo largo del año. Los machos tuvieron un incremento significativo de E2 de marzo a julio, los niveles de T permanecieron sin variaciones significativas a través del año y los niveles plasmáticos de 11-KT incrementaron de marzo hasta julio. Se observó un decremento agudo en agosto lo que coincidió con el periodo de post-desove.

Palabras clave: esteroides sexuales, reproducción artificial, desarrollo gonadal, *Mycteroperca rosacea*, cambio de sexo

ABSTRACT

This study focuses on 3 basic aspects of Leopard grouper, *Mycteroperca rosacea* reproduction in captivity.

The reproductive period through gonad development was described by histology samples obtained by monthly catheterization of the gonad. Oocytes from samples were classified in 5 development categories. Oocyte distribution was obtained for the reproductive cycle. Females in captivity developed oocytes in late stages of vitellogenesis from March to June where atresic oocytes were observed indicating the end of the reproductive cycle. Two individuals that were females in February were found in bi-sexual immature stage of development in March and as males in April. Transition stage was observed during the reproductive period and included primary oocyte degeneration and the proliferation of spermatogonial cells.

The effects of Human Chorionic Gonadotropin and the Luteinizing Hormone release analog to induce Final Oocyte Maturation was analyzed for results in fecundity, fertilization rate and the total number of viable eggs. Females were treated either with 1,500 IU Kg⁻¹ HCG, 15 µg Kg⁻¹ LHRHa or 150 µg Kg⁻¹ LHRHa. During the study, 38 wild females were induced to spawn on the same day of capture and other 59 females were maintained in captivity at least ten months before induction to spawn trials. Females induced to spawn with HCG produced the highest number of fertilized and viable eggs ($P < 0.05$) attaining a total fecundity from 3 to 571×10^3 eggs and a fertilization rate from 3 to 100%. Mean fertilized egg diameter was 871 ± 14 µm and over 9.5×10^6 eggs were obtained.

Finally, the concentration of common sex steroids (E2, T, y 11-KT) contained in blood of captive broodstock was quantified during one reproductive cycle. The results were compared and related to gonad development. During the year, ovaries contained a higher proportion of previtellogenic oocytes. Ovulation rate was elevated in June and E2 levels increased in April, T maintained without significant changes with the exception of July during post-spawning. 11-KT maintained without significant changes throughout the year. Males had a significant E2 increase from March to July, T maintained without variations throughout the year and 11-KT concentration increased from March to July with a sharp decrease in August which coincided with the post-spawning period.

Key words: sex steroids, artificial reproduction, gonad development, *Mycteroperca rosacea*, sex change

DEDICATORIA

*“A mi abuela... Siempre te amaré”
Nilda Francisca Ortíz
Rodríguez
(1918 – 2008)*

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca número 172897 otorgada para la realización de mis estudios de posgrado y por otorgar la beca mixta como apoyo de mi estancia doctoral en el Instituto de Acuicultura de Torre la Sal (IATS) en Castellón, España.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por el apoyo brindado durante este estudio y por todos los años que fue mi segundo hogar.

Al Dr. Vicente Gracia López por su apoyo incondicional y haber aceptado dirigir este trabajo.

A el comité tutorial, los Dres. Humberto Villarreal, Ángel Campa, Manuel Carrillo y Silvia Zanuy por sus revisiones y sus consejos a lo largo de este estudio.

Al Sr. Jorge Sandoval por asistencia técnica con todo lo relacionado al mantenimiento de los reproductores, su cuidado y ayuda durante los muestreos.

A M.C. Carmen Rodríguez del laboratorio de histología del CIBNOR por la ayuda brindada en el procesamiento de muestras histológicas y la descripción de las mismas.

A Soledad Ibáñez del IATS por la asistencia técnica en los análisis de EIA para la cuantificación de los esteroides sexuales.

A las Dras. Minerva Maldonado y Danitzia Guerrero por su incondicional apoyo.

Al Sres. Miguel y Juanita León por su ayuda en la captura de los reproductores de cabrilla sardinera en la localidad de Punta Alta, B.C.S. y por recibirnos en su casa, alimentarnos y mantener una gran amistad.

A Horacio Sandoval por su ayuda en el laboratorio de cómputo de posgrado del CIBNOR.

A mi familia primeramente a mi madre Nilda y a Cris. También a mi Papá, Ale, Marce, mis sobrinos y sobre todo a mi abuela por apoyarme siempre. Los quiero.

A todos mis amigos que me han acompañado y apoyado durante todos estos años brindándome amistad, sabios consejos y sobretodo diversión.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. Biología de la especie y estatus poblacional	1
2. Antecedentes de investigación con la cabrilla sardinera	3
3. Reproducción de los peces teleósteos	6
3.1. Papel de las hormonas en la reproducción de peces.....	7
3.1.1. Gonadotropinas (GtH)	8
3.1.2. Vitelogénesis	9
3.1.3. Esteroides sexuales	12
3.1.2.1. Andrógenos.....	13
3.1.2.2. Estrógenos.....	16
3.1.2.4. Esteroides sexuales en la maduración	18
3.2. Hermafroditismo en meros.....	20
3.2.1. Cambio de sexo.....	22
3.2.2. Consecuencias del hermafroditismo para la acuicultura	22
3.2.3. Morfología de las gónadas de organismos hermafroditas	23
3.2.4. Papel de las hormonas en el cambio de sexo	24
4. Reproducción artificial de peces marinos en cautiverio	26
4.1. Hormonas empleadas para la inducción al desove.....	27
4.2. Cuantificación de esteroides sexuales en plasma sanguíneo: Ventajas del uso de Inmuno-Ensayos (EIA)	30
5. Acuicultura mundial de especies de meros	31
JUSTIFICACIÓN	34
HIPÓTESIS	36
OBJETIVOS	37
1. Objetivo general	37
2. Objetivos específicos	38
MATERIAL Y MÉTODOS	39
1. Descripción del desarrollo gonadal de reproductores de <i>M. rosacea</i> mantenidos en cautiverio	41
1.1. Organismos experimentales	41
1.2. Histología de la gónada	41
2. Efecto de la HCG y LHRHa sobre la inducción de la maduración final del ovocito, la ovulación y la calidad del desove.	44
2.1. Organismos experimentales	44

2.2. Inducción con HCG de peces en cautiverio	45
2.3. Inducción con HCG de peces silvestres.....	46
2.4. Inducción con LHRHa de reproductores en cautiverio.....	46
2.5. Grupo control	47
2.6. Determinación del momento de desove y calidad del desove	48
3. Ciclo anual de los esteroides sexuales (E2, T y 11-KT) y su relación con el desarrollo gonadal	50
3.1. Organismos experimentales	50
3.2. Análisis de esteroides sexuales	51
3.2. Análisis de esteroides sexuales (EIA).....	52
3.2.1. Preparación de los buffers y reactivos (Apéndice I).	52
3.2.2. Recubrimiento de las placas con el anticuerpo monoclonal.....	53
3.2.3. Extracción de plasma con metanol para el análisis de esteroides ...	54
3.2.4. Preparación de la placa para el análisis de esteroides sexuales	55
Testosterona	55
11-Ketotestosterona.....	56
Estradiol.....	57
4. Análisis estadísticos	57
RESULTADOS	59
1. Descripción del desarrollo gonadal de reproductores de <i>M. rosacea</i> mantenidos en cautiverio	59
2. Efecto de la HCG y LHRHa sobre la inducción de la maduración final del ovocito, la ovulación y la calidad del desove.	67
2.1. Proporción sexual	67
2.2. Desarrollo gonadal.....	68
2.3. Inducción con HCG y calidad del desove.....	70
2.4. Inducción con LHRHa y calidad del desove.....	75
2.5. Grupo control	78
2.6. Diferencias entre los tratamientos.....	78
3. Relación entre la concentración de esteroides sexuales y el desarrollo gonadal de reproductores de <i>M. rosacea</i>.....	81
3.1. Hembras	81
3.1.1. Desarrollo gonadal	81
3.1.2. Concentración de esteroides sexuales de hembras	83
Estradiol.....	83
Testosterona.....	84
11-Ketotestosterona.....	84
3.2. Machos	85
3.2.1. Concentración de esteroides sexuales en machos	85
Estradiol.....	85
Testosterona.....	86
11-Ketotestosterona.....	86

3.3. Concentración de esteroides sexuales en peces bisexuales	88
3.3.1. Desarrollo gonadal	88
3.3.2. Concentración de esteroides sexuales en el cambio de sexo	89
Estradiol	89
Testosterona	90
11-Ketotestosterona	90
DISCUSIÓN	92
1. Descripción del desarrollo gonadal de reproductores de <i>M. rosacea</i> mantenidos en cautiverio	92
2. Efecto de la HCG y LHRHa sobre la inducción de la maduración final del ovocito, la ovulación y la calidad del desove.	96
3. Relación entre la concentración de esteroides sexuales y el desarrollo gonadal.....	103
CONCLUSIÓN.....	114
LITERATURA CITADA.....	116
APÉNDICE I.....	130
1. Tampones y reactivos empleados para ELISA	130
1.1. Potassium Phosphate Buffer (PPB) 1 M	130
1.2. Buffer de Reacción (RB)	130
1.3. Buffer de Saturación	131
1.4. Buffer de Lavado.....	131
1.5. Reactivo de Ellman (50X)	131
APENDICE II.....	133

LISTA DE PUBLICACIONES

Kiewek-Martínez, M., Gracia-López, V., Carrillo-Estevez, M. 2009. Comparison of the Effects of HCG and LHRHa on the Induction of Ovulation of Wild and Captive Leopard Grouper, (*Mycteroperca rosacea*). Journal of the World Aquaculture Society. Aceptado.

Kiewek-Martínez, M., Gracia-López, V., Carrillo, M., Zanuy, S. 2009. Reproductive cycle of leopard grouper *Mycteroperca rosacea* (Streets 1877) held in captivity: relationship between gonad development and sex steroid concentration. Aquaculture International. Sometido.

Kiewek-Martinez, M., Gracia-Lopez, V., Rodriguez-Jaramillo, C. 2009. Description of gonad development of leopard grouper (*Mycteroperca rosacea*) (Streets, 1877) held in captivity. Hidrobiológica. Sometido.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Reproductor de cabrilla sardinera, <i>Mycteroperca rosacea</i>	1
Figura 2. Distribución geográfica de la cabrilla sardinera, <i>M. rosacea</i>	2
Figura 3. Regulación hormonal de la vitelogénesis en peces teleósteos.....	10
Figura 4. Sistema de recirculación de agua del patio de cultivos del CIBNOR.	40
Figura 5. Cateterización ovárica de un reproductor de <i>M. rosacea</i>	43
Figura 6. Inducción hormonal con HCG en la musculatura dorsal de la cabrilla sardinera, <i>M. rosacea</i>	45
Figura 7 Inducción hormonal intra-peritoneal con LHRHa de la cabrilla sardinera, <i>M. rosacea</i>	47
Figura 8. Masaje abdominal para la obtención de desoves de hembras inducidas hormonalmente.....	49
Figura 9. Extracción de sangre del pedúnculo caudal de la cabrilla sardinera, <i>M. rosacea</i>	51
Figura 10. Peso de los reproductores de cabrilla sardinera, <i>Mycteroperca rosacea</i> mantenidos en cautiverio de enero a julio de 2003.....	59
Figura 11. Distribución de los estadios de desarrollo ovárico de los reproductores de <i>Mycteroperca rosacea</i> en cautiverio.....	62
Figura 12. Estadios de desarrollo ovárico de la cabrilla sardinera, (<i>M. rosacea</i>) mantenida en cautiverio.....	63
Figura 13 Gónada de la cabrilla sardinera <i>M. rosacea</i> en estadio de transición sexual.....	66
Figura 14. Variaciones mensuales del fotoperiodo y temperatura. Cambio en el tamaño del diámetro medio de los ovocitos y abundancia relativa de los diferentes estadios de maduración de hembras reproductoras de <i>M. rosacea</i> mantenidas en cautiverio.....	69
Figura 15. Variaciones mensuales de los estadios gonadales, niveles plasmáticos de Estradiol (E2), testosterona (T) y los cambios medioambientales de la temperatura y fotoperiodo de hembras reproductoras de la cabrilla sardinera, <i>M rosacea</i> en cautiverio.....	82
Figura 16. Variación mensual de los niveles plasmáticos de testosterona (T), 11-ketotestosterona (11-KT) y el porcentaje de machos en espermiación.....	87
Figura 17. Desarrollo gonadal del individuo bisexual y los niveles plasmáticos de esteroides sexuales durante el periodo experimental.....	89

LISTA DE TABLAS

Tabla I Desarrollo gonadal de hembras mantenidas en cautiverio de la cabrilla sardinera <i>M. rosacea</i>	61
Tabla II. Distribución sexual de <i>M. rosacea</i> en cautiverio durante 2003.	64
Tabla III. Número total de reproductores de <i>M. rosacea</i> y proporción sexual de los peces en cada categoría de peso.	67
Tabla IV. Resumen de las inducciones al desove con HCG de hembras de la cabrilla sardinera, <i>M. rosacea</i> mantenidas en cautiverio.	73
Tabla V. Resumen de las hembras silvestres de <i>M. rosacea</i> inducidas a desovar con HCG	74
Tabla VI. Resumen de los resultados de las inducciones al desove con LHRHa en hembras cautivas de <i>M. rosacea</i>	77
Tabla VII Resumen de los resultados de las inducciones hormonales de <i>M. rosacea</i> de los diferentes tratamientos experimentales	80
Tabla VIII. Valores máximos de esteroides sexuales encontrados en el plasma sanguíneo de la cabrilla sardinera <i>M. rosacea</i> , durante parte del 2004 y todo el 2005	133
Tabla IX. Concentración de esteroides sexuales durante el periodo experimental.	135

LISTA DE ABREVIATURAS

- Ng ml⁻¹; nanogramos por mililitro
- h; horas
- ANOVA; Análisis de varianza de una vía
- CBA, Capture based aquaculture= Acuicultura basada en la captura
- ES; Error estándar
- UE; Unidades Ellman
- EIA; Inmuno Ensayo Específico
- Kg.; kilogramos
- cm.; centímetros
- n; número
- μ; Micras
- μl; Microlitro
- ‰; Partes por mil
- 11-KT; 11-Ketotestosterona
- C₂₁; Hormona esteroidea (MIS)
- DDW; Agua doblemente destilada
- E2; Estradiol
- ES; Error estándar
- FOM; Maduración final del ovocito
- FSH; Hormona Folículo estimulante
- g; Gramos
- HCG; Gonadotropina Coriónica Humana
- GnRH; Hormona Liberadora de Gonadotropina
- GnRH_a; análogo de la Hormona Liberadora de Gonadotropina
- GtH II; Gonadotropina del tipo II
- GtHs; Gonadotropinas
- GVBD; Estadio de migración de la vesícula germinal
- IG; Índice gonadosomático
- LH; Hormona Luteinizante
- LHRH; Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante
- LHRH_a; Análogo de la Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante
- min; minuto
- MIS; Esteroide Inductor de la Maduración
- ml; Mililitro
- mRNA; RNA mensajero
- MT; Metiltestosterona
- n; Número de muestras
- °C; Grados centígrados
- PPB; Potassium Phosphate Buffer

- RB; Buffer de Reacción
- rpm; Revoluciones por minuto
- T; Testosterona
- VTG; Vitelogenina

INTRODUCCIÓN

1. Biología de la especie y estatus poblacional

La cabrilla sardinera, *Mycteroperca rosacea*, es una especie clasificada en el grupo de los meros que pertenece a la familia Serranidae, (subfamilia Epinephelinae) (Heemstra y Randall, 1993). Los meros habitan principalmente las aguas tropicales, subtropicales y mares templados (Bruslé y Bruslé, 1975; Abu-Hakima, 1987; Lee *et al.*, 2002). La cabrilla sardinera (Inglés: Leopard grouper) es una de las 5 especies del género *Mycteroperca* que se encuentran en aguas tropicales del Pacífico (Rosenblatt y Zahuaranec, 1967; Heemstra y Randall, 1993) (Figura 1).



Figura 1 Reproductor de cabrilla sardinera, *Mycteroperca rosacea*.

Se distribuye en la costa sur oriental de la península de Baja California (Pacífico Central del este) y en todo el golfo de California hasta Jalisco, México (Figura 2). Su hábitat incluye áreas rocosas cerca de la línea de costa y alrededor de islas y

zonas de praderas submarinas (Allen y Robertson, 1998; Mendoza Bustamante, 2002). Se localizan en profundidades menores a 50 m donde la temperatura anual del agua fluctúa entre los 20 y 30 °C y la salinidad entre los 34 y 35 ‰ (Heemstra y Randall, 1993; Gracia López *et al.*, 2004a). Es un componente importante de las pesquerías artesanales y deportivas de Baja California Sur, particularmente en la Bahía de La Paz y sus áreas aledañas (Peláez Mendoza, 1997; Díaz Uribe *et al.*, 2001). Es una especie que se adapta fácilmente a las condiciones de cautiverio y es resistente a enfermedades y manejo (Gracia López com. Pers.). La cabrilla sardinera tiene un alto precio en el mercado y una gran demanda para consumo local (Gracia López *et al.*, 2004b).

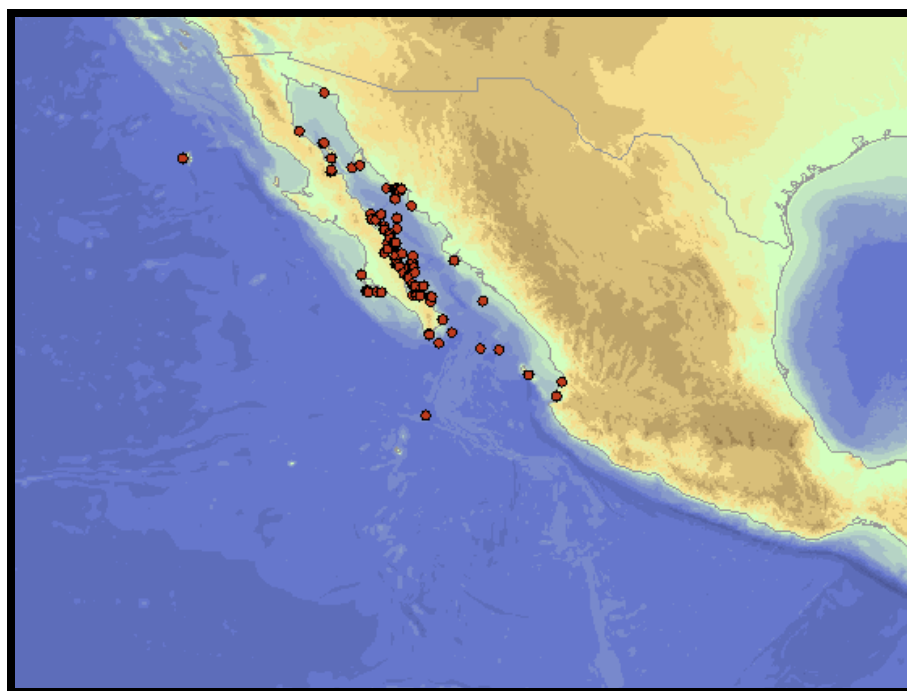


Figura 2. Distribución geográfica de la cabrilla sardinera, *M. rosacea*.

La sobre-explotación de la especie, ha llevado a que se haya introducido en la lista roja de especies amenazadas (IUCN “Red List of Threatened Species -VU A1d+2d”), en la cual ha sido catalogada como una especie con riesgo a la extinción en el medio natural en mediano plazo. Se estima que la población de esta especie sufra una reducción de >20% en los próximos diez años o tres generaciones, lo que ocurra primero y con base a los niveles de explotación (IUCN, 2006). Por este motivo y por el interés comercial de la especie, se ha hecho un esfuerzo para incrementar la producción controlada de juveniles con la finalidad de alcanzar una producción sostenible para futuros planes de repoblamiento y abastecimiento comercial (Gracia López *et al.*, 2004a, 2004b, 2005).

2. Antecedentes de investigación con la cabrilla sardinera

Los estudios de la biología de la cabrilla sardinera han sido basados en la alimentación natural donde los resultados más destacables indican que los individuos adultos se alimentan de bancos de arenque, *Harengula thrissina*, anchovetas, *Cetengraulis mysticetus* y otros peces (Peláez Mendoza, 1997), y que los juveniles se alimentan durante el día, de peces y crustáceos bentónicos (Hobson, 1968). Los estudios de la edad y crecimiento indican que la cabrilla sardinera es un pez con una baja tasa de crecimiento, atribuido principalmente a sus hábitos alimenticios (Díaz Uribe *et al.*, 2001). También, se han realizado

estudios de la ecología del reclutamiento los cuales han sido basados en la relación entre la abundancia de la cabrilla sardinera y la disponibilidad de las zonas de sargazo como hábitat de asentamiento (Mendoza Bustamante, 2002).

Desde el año 2001 ha sido posible realizar investigación sobre la reproducción y el cultivo larval de *M. rosacea* en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) en La Paz, B.C.S., México. Dentro de estos estudios se encuentran trabajos de inducción hormonal con Gonadotropina Coriónica Humana (HCG) de organismos silvestres con una producción de más de 40,000 huevos hembra⁻¹, la descripción del desarrollo embrionario y la morfología de huevos y larvas hasta el momento de la primera alimentación (Gracia López *et al.*, 2004a). Se han realizado estudios con reproductores silvestres y en cautiverio inducidos al desove con HCG y el análogo de la Hormona Liberadora de Hormona Luteinizante (LHRHa) obteniendo fecundidades superiores a $2,358 \times 10^3$ huevos y una tasa de fertilización total de 62 % (Kiewek Martínez, 2004). También ha sido posible comprobar, el efecto de la temperatura y la salinidad sobre huevos y larvas (Linares-Aranda, 2003; Gracia-López *et al.*, 2004b), y la producción de larvas y juveniles en una pequeña escala piloto (Gracia-López *et al.*, 2005).

Se estudió el efecto de la infección con *Aeromonas hydrophila* sobre dos de los periodos iniciales de vida (embrión y juvenil) registrando la supervivencia, parámetros hematológicos y alteraciones histopatológicas. En el periodo embrionario, en el paso de la fase de embrión a embrión libre, no se encontraron

diferencias significativas en los porcentajes de eclosión. Durante la fase de embrión libre y después de 23 horas de haberse infectado, se encontró una menor supervivencia. Con respecto al periodo juvenil no existe diferencia significativa en la concentración de hemoglobina ni en la cuenta total de leucocitos. Se encontraron alteraciones en el hígado y conforme se incrementó la dosis, el daño se presentó en el riñón y en el intestino (Gómez-Rojo, 2007).

Se analizaron los factores genéticos que influyen la respuesta inmune de la cabrilla sardinera al ser infectada con bacterias. En específico, se analizó la expresión génica diferencial en el riñón de *M. rosacea* a partir de un bioensayo de vacunación genética con el vector plasmídico pOMP48-LP. Del análisis de despliegue diferencial del ADNc se obtuvieron 7 EST's semejantes a secuencias génicas de teleósteos con función hipotética con 5 genes (IGSF11, SKIV2L, Yippee, MERTK y AP) relacionados al sistema inmune. El despliegue diferencial mostró evidencia sobre la capacidad de la vacunación genética, en estimular una respuesta inmune específica bacteriana, sin efectos inflamatorios (Zepeda-Núñez, 2007).

Sin embargo, sigue existiendo baja supervivencia larval en la primera alimentación, lo que ha llevado a estudios de enzimología, morfología larval y el uso de probióticos. Se ha estudiado la morfología larval relacionada con el tamaño de la boca de la larva (Martínez-Lagos y Gracia-López, 2009), y la evaluación de

la capacidad digestiva de la cabrilla sardinera (*M. rosacea*) durante su desarrollo larvario (Martínez-Lagos *et al.*, *En prensa*).

En cuanto a los probióticos, se evaluó la administración en la dieta de la levadura marina (*Debaryomyces hansenii*, cepa CBS 8339), se observó un gran potencial de adhesión en el intestino y se obtuvieron diferencias significativas en hemoglobina (IgM), supervivencia y proteína plasmática en peces alimentados con la dieta-levadura (Reyes *et al.*, 2008). También se está analizando la expresión génica diferencial en los linfocitos ante la infección experimental por *Aeromonas hydrophila*. La adición de la levadura en peces retados con *A. hydrophila*, produjo un aumento significativo en IgM, y las enzimas superóxido dismutasa y catalasa así como la expresión molecular de los genes CAT y HSP. Se han obtenido también, los valores de las variables hematológicas en juveniles (Reyes *et al.*, 2008).

3. Reproducción de los peces teleósteos

En los vertebrados, el sistema neuroendocrino es fundamental para el control de la reproducción. La percepción de los estímulos ambientales como el fotoperiodo y la temperatura, entre otros, está regida por el sistema nervioso e incluye el paso del estímulo desde los receptores sensoriales al cerebro (Zanuy y Carrillo, 1987). En el hipotálamo se producen hormonas que son transportadas a través de axones

neuronales a la pituitaria, donde inhibirán o estimularán la liberación de gonadotropinas al torrente circulatorio (Peter, 1983; Zanuy y Carrillo, 1987; Nagahama, 1994; Peter y Yu, 1997; Weltzien, 2004). La glándula pituitaria, tanto por su origen como por su función, es la más compleja e importante del sistema endócrino. Es un lugar de síntesis, almacenaje y liberación de varias hormonas peptídicas. Puede ser considerada como un transductor que, a través de sus secreciones, posibilita que el sistema nervioso central controle un rango muy amplio de funciones endocrinas, como la reproducción, la osmorregulación, el crecimiento y alguna forma de control del metabolismo (Zanuy y Carrillo, 1987).

3.1. Papel de las hormonas en la reproducción de peces

En el hipotálamo de los peces teleósteos, podemos encontrar la presencia de la Hormona Liberadora de Gonadotropina (GnRH). Los cambios en las concentraciones hipotalámicas de GnRH, generan cambios en la actividad gonadal (Peter, 1983). Está bien establecido, que las gonadotropinas son las principales hormonas en la regulación de la gametogénesis, estas no actúan directamente sino que trabajan en conjunto con esteroides gonadales que regulan los procesos de gametogénesis (Nagahama, 1994).

3.1.1. Gonadotropinas (GtH)

En los teleósteos, como en todos los vertebrados, sin excepción, las funciones de la gónada son mantenidas gracias a las Gonadotropinas (GtHs). Las células productoras de gonadotropina tienen, por tanto, una posición importante en la cadena de estructuras que sirven para asegurar la reproducción y la supervivencia de las especies y son los artífices finales del proceso de crecimiento gonadal, maduración y desove (Zanuy y Carrillo, 1987; Nagahama, 1994). En los teleósteos, la maduración de los ovocitos está acompañada por un incremento significativo en los niveles plasmáticos de gonadotropina y los niveles de esteroides de la gónada (Mylonas *et al.*, 1997).

Existe evidencia de la existencia de dos tipos de GtHs que son químicamente distintas, la Gonadotropina del tipo I (GtH I) que se encuentra relacionada a la Hormona Luteinizante (LH) de tetrápodos (Kah *et al.*, 1989; Nagahama, 1994; Mylonas *et al.*, 1997; Mylonas *et al.*, 1998) y aumenta en concentración durante el periodo de gametogénesis y espermatogénesis (Nagahama, 1994) y la Gonadotropina del tipo II (GtH II) que guarda relación con la Hormona Folículo Estimulante (FSH) debido a que se encuentra principalmente involucrada en la activación de la Maduración Final del Ovocito (FOM) (Kah *et al.*, 1989; Nagahama, 1994; Tyler y Sumpter, 1996; Mylonas *et al.*, 1997; Mylonas *et al.*, 1998). Los niveles de GtH II plasmáticos en ocasiones son indetectables durante la fase

previa a la FOM e incrementan gradualmente durante ésta, mostrando un pico pronunciado justo antes de la ovulación (Nagahama, 1994; Mylonas *et al.*, 1997).

3.1.2. Vitelogénesis

La vitelogénesis es el evento principal responsable del crecimiento de los ovocitos en peces. La principal función es el secuestro y el empaquetamiento de vitelogenina. El estradiol producido dentro del ovario bajo la influencia de las gonadotropinas es introducido hacia el sistema vascular y estimula la síntesis y la secreción hepática de la vitelogenina (Nagahama, 1994) (Figura 3).

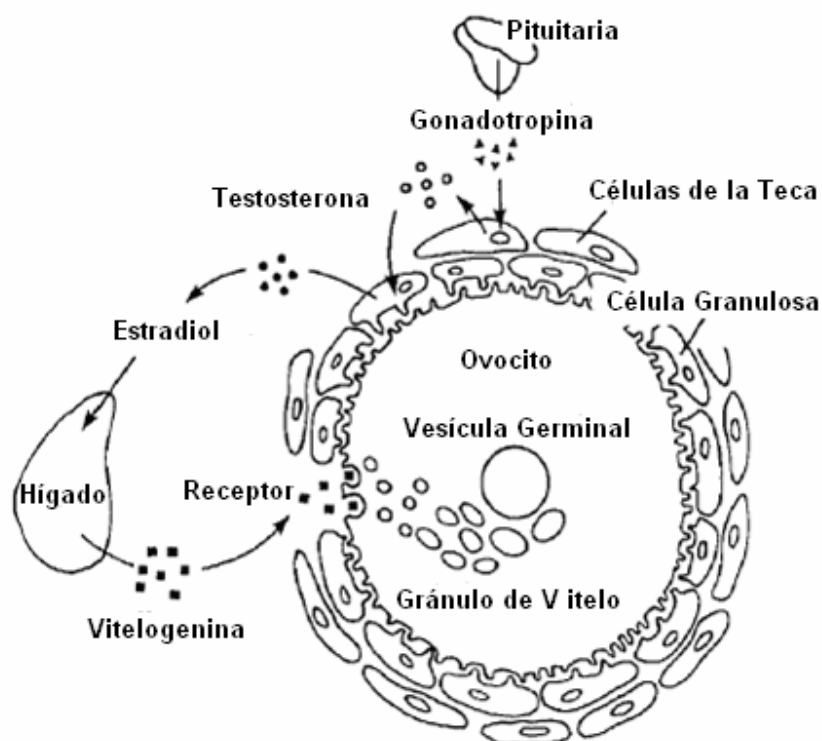


Figura 3. Regulación hormonal de la vitelogenénesis en peces teleosteos

La vitelogenina (VTG) es una glicolipofosfoproteína de plasma específica de las hembras en estado de maduración y coincide con la aparición de gránulos de vitelo por debajo de la membrana vitelina. Ésta comparte muchas características con las VTGs de aves y reptiles (Devlin y Nagahama, 2002).

La estimulación gonadotrópica del ovario durante la vitelogenénesis da como resultado la producción de T, y su aromatización hacia E2 la cual estimula la producción hepática de VTG (Mylonas *et al.*, 1998). Prat *et al.*, (1990) en estudios

con *D. labrax* observan una relación directa entre los niveles de T y E2 plasmáticos y la evolución del diámetro de los ovocitos durante el periodo de gametogénesis y de desove sugiriendo que el E2 se encuentra involucrado en la síntesis de VTG durante la vitelogénesis y que la producción de E2 es dependiente de la T.

Los niveles plasmáticos de GtH II son mayores en el estadio vitelogénico, debido a que se han observado elevaciones significativas en E2 y T, durante el estadio de migración de la vesícula germinal. La participación de GtH II en la estimulación de la esteroidogénesis del ovario y el inicio de la FOM aún no ha sido comprobada. Es posible que el ovario sea sensible a la estimulación con GtH II al final de la vitelogénesis y un pequeño y estadísticamente insignificante incremento de GtH II en el plasma sea suficiente para inducir un cambio significativo en la producción esteroidogénica (Mylonas *et al.*, 1997).

Se ha sugerido que un incremento en E2 plasmático durante la post-vitelogénesis puede funcionar como una señal para la finalización de la vitelogénesis, propiciar la síntesis de GtH II de la pituitaria como preparación para el incremento de GtH II pre-ovulatorio o facilitar el desarrollo de la competencia de madurez de los ovocitos (Mylonas *et al.*, 1997).

Los niveles máximos de VTG se observan dos meses antes del desove y se mantienen elevados durante toda la época de desove y varios días post-desove.

El perfil anual de los niveles plasmáticos de VTG ha sido corroborado con el desarrollo de los ovocitos vitelogénicos dentro del ovario (Mañanós *et al.*, 1994).

Al finalizar la vitelogénesis, hay un surgimiento de la GtH II plasmática, la cual induce una caída en el nivel plasmático de E2, un incremento en T y una gran elevación de los niveles del Esteroide Inductor de la Maduración (MIS), el progestrógeno que induce FOM. (Aida, 1988; Mylonas *et al.*, 1998).

3.1.3. Esteroides sexuales

Las hormonas esteroideas son sintetizadas en las gónadas por el estímulo de las gonadotropinas para después ser transportadas por el torrente sanguíneo (Nagahama, 1994; Bhandari *et al.*, 2004b). En los machos, son sintetizadas en las células de Leydig (Yaron, 1995; Yaron y Sivan, 2006), y juegan un papel fundamental en la gametogénesis, la regulación del comportamiento reproductivo y el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios (Aida, 1988; Nagahama, 1994; Schulz y Miura, 2002; Patiño y Sullivan, 2002; Yaron *et al.*, 2003). Por lo que en la mayoría de los estudios de endocrinología de peces, se considera importante la concentración de esteroides en la sangre de los organismos reproductores.

Dentro de los esteroides sexuales más comúnmente estudiados se encuentran, el Estradiol (E2), la Testosterona (T) y 11-Ketotestosterona (11-KT) (Chan y Yeung,

1989). Estos niveles de esteroides en el plasma nos proporcionan información acerca de la situación en la que se encuentra el eje pituitaria-gónada y por lo tanto del estatus reproductivo del pez (Merson *et al.*, 2000).

Existe un gran interés en los cambios rápidos que acompañan la maduración gonadal final de los peces. Gracias a estos estudios, se ha podido asegurar que los andrógenos son precursores de estrógenos y que éstos son liberados hacia el plasma cuando no son requeridos para su aromatización (Prat *et al.*, 1990). La ruta de producción de los esteroides sexuales comienza con la síntesis de pregnenolona que es un precursor esteroidal que produce esteroides mediante la abertura de colesterol, que es seguido por la producción de progesterona, 17 α -hydroxypregnenolona, 17 α -hydroxyprogesterona, dehydroepiandrosterona y androstenediona (Devlin y Nagahama, 2002).

3.1.2.1. Andrógenos

Los andrógenos (T y 11-KT) juegan un papel fundamental en la diferenciación sexual de los peces (Baroiller *et al.*, 1999; Rohr *et al.*, 2001; Devlin y Nagahama, 2002). La T es producida en las células de la teca dentro de la gónada (Kagawa *et al.*, 1982) y es el precursor de 11-KT y E₂ (Kroon y Liley, 2000; Devlin y Nagahama, 2002; Barannikova *et al.*, 2004). El tejido de la teca ovárico, contiene todas las enzimas necesarias para la producción de T y de otros andrógenos

precursores, mientras que la granulosa no sintetiza esteroides de *novo* pero es capaz de convertir la T a estrógenos mediante la enzima aromatasa (Devlin y Nagahama, 2002). En algunos peces hermafroditas protogíneos como el perico, *Thalassoma bifasciatum*, los derivados de T inducen los caracteres sexuales secundarios de los machos y son responsables de la masculinización de la gónada (Lone *et al.*, 2001) promoviendo el desarrollo de esperma (Rodríguez *et al.*, 2001).

La 11-KT se encuentra, por lo general, en mayor concentración en machos ya que es un esteroide esencial para las funciones reproductivas aunque ha sido cuantificada también en hembras (Lone *et al.*, 2001; Lokman *et al.*, 2002; Alam *et al.*, 2005); Es un andrógeno potente en la mayoría de los peces estudiados (Cuisset *et al.*, 1994; Mylonas *et al.*, 1997) y es sintetizado a partir de la T por las enzimas P45011 β y 11 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa dentro de los intersticios testiculares (Alam *et al.*, 2005). En los machos, juega un papel muy importante en la maduración sexual, en el desarrollo de caracteres sexuales secundarios y el comportamiento reproductivo (Alam *et al.*, 2005). Es sintetizada en la testis de todos los peces teleósteos y los niveles plasmáticos se correlacionan con el Índice Gonadosomático (*IG*) y la espermiación (Cuisset *et al.*, 1994; Nagahama, 1994; Kroon y Liley, 2000; Lone *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2001; Rohr *et al.*, 2001; Schulz y Miura, 2001; Alam *et al.*, 2005). En las hembras se cree que este andrógeno se encuentra involucrado en los cambios morfológicos que ocurren durante la maduración sexual (Rohr *et al.*, 2001; Barannikova *et al.*, 2004),

pudiendo ser el inductor final de la reversión sexual de peces hermafroditas protogíneos (Kroon y Liley, 2000; Higa *et al.*, 2003; Bhandari *et al.*, 2004b; Alam *et al.*, 2005; Sarter *et al.*, 2006), aunque su papel en ésta es dependiente de la especie y las condiciones medioambientales (Lone *et al.*, 2001).

Los andrógenos, principalmente la T y la 11-KT han sido medidos en el plasma de los peces durante el ciclo sexual. Los niveles más elevados se presentan durante la época reproductiva coincidiendo con la presencia de espermatozoos (Fostier *et al.*, 1983). Este incremento se prolonga a través de la mayor parte del periodo de gametogénesis y de desove. En este caso, el papel de 11-KT puede estar más relacionado con la iniciación de la espermiación (Prat *et al.*, 1990). Prat *et al.* (1990) en estudios con la lubina, *Dicentrarchus labrax*, observan un segundo pico de T al final del periodo post-desove al inicio del periodo de pre-gametogénesis y que este incremento fue superior que el observado durante el periodo de desove aunque no se relaciona con el nivel plasmático de (11-KT) de machos y de E2 de hembras. Por lo que concluyen que la T puede jugar un papel diferente en el desarrollo reproductivo al final del periodo post-desove. También se ha observado que los niveles en plasma de T y 11-KT (en ambos forma libre y conjugada) decrecen significativamente al progresar el periodo espermático. Los niveles de 11-KT son más altos que los de T, lo que indica una mayor relevancia de este andrógeno.

Además, estudios recientes sugieren que cantidades significativas de 11-KT circulan en la sangre de las hembras de los peces teleósteos y que la 11-KT incrementa notablemente durante las fases finales de la ovogénesis lo que indica que este esteroide juega un papel funcional en la ovogénesis de los teleósteos (Alam *et al.*, 2005).

3.1.2.2. Estrógenos

El E2 es el esteroide sexual responsable de la diferenciación sexual de las hembras (Strüssmann y Nakamura, 2002; Bhandari *et al.*, 2004b) y también se encuentra relacionado al comportamiento reproductivo (Kroon y Liley, 2000). El decremento de los niveles de E2 tiene como consecuencia la interrupción de la vitelogénesis lo que produce la degeneración de los ovocitos y en algunos casos lleva al desarrollo de testas (Sarter *et al.*, 2006; Bhandari *et al.*, 2004b).

El precursor de E2 es la T, cuya síntesis es un proceso de dos células que involucra a las células de la teca y granulosa y es un factor importante para la producción de esteroides sexuales durante la maduración sexual (Devlin y Nagahama, 2002). Está bien establecido que el E2 es la hormona que principalmente estimula la producción hepática de VTG en teleósteos y que el nivel de E2 plasmático incrementa con el desarrollo gonadal estacional (Harmin *et al.*, 1995). También, el E2 es responsable de disparar el incremento de la LH. En

los teleósteos con ovarios sincrónicos por grupos el incremento de gonadotropina ovulatoria sucede cíclicamente en la ovulación como sucede con la Hormona Luteinizante (HL) en aves y mamíferos. El E2 actúa a nivel gonadal para estimular el desarrollo de los ovocitos pero también actúa indirectamente controlando la expresión de los genes en los tejidos no gonadales, los cuales son necesarios para el crecimiento de los ovocitos (Devlin y Nagahama, 2002).

En estudios con la dorada, *Sparus aurata*, un pez que desova múltiples veces, se han encontrado altos niveles de E2 durante la época de desoves (Prat *et al.*, 1990). Por otro lado, algunos autores han observado una buena correlación entre los niveles plasmáticos de E2, el IG y el tamaño de los ovocitos durante el periodo de vitelogénesis (Prat *et al.*, 1990). Kobayashi *et al.*, 1986, demuestran en estudios con carpas, que el E2 se produce principalmente en la primera parte del ciclo ovulatorio y que la T en la última parte, seguido por un incremento de GtH y la ovulación al final del ciclo.

En algunas especies de salmónidos, la ovulación es precedida por un decremento continuo primero de E y después de los niveles de T y un incremento drástico en 17α -hydroxy, 20β -dihydroprogesterona ($17\alpha,20\beta$ -OHP), que puede ser el esteroide más probable para inducir la maduración en salmónidos (Zohar *et al.*, 1986).

3.1.2.4. Esteroides sexuales en la maduración

Kobayashi *et al.* (1986) describen los cambios que ocurren durante los ciclos ovulatorios de las carpas japonesas, sintetizándolos en 4 puntos principales:

- Incremento de E2 el cual estimula la vitelogénesis.
- Incremento gradual de T seguido del incremento de E2.
- Incremento de GtH ovulatorio que causa un incremento en T seguido por un cambio de la producción de hormonas esteroideas de T a $17\alpha,20\beta$ -diOH-P que es un MIS de los ovocitos.
- Ocurre la ovulación con el incremento de GtH que puede estar asociado con la producción de prostaglandinas.

Los folículos vitelogénicos producen exclusivamente E2 y los folículos posvitelogénicos producen T y no E2. Los cambios, en el plasma, de la concentración del esteroide dominante de E2 a T parece ser el reflejo de un desarrollo progresivo de los folículos durante el ciclo ovulatorio (Kobayashi *et al.*, 1986).

Los efectos de los andrógenos como la T y el esteroide sintético 17α -metiltestosterona (MT), en la maduración del ovario, generalmente es atribuida a

su aromatización. Debido a que 11-KT no es capaz de aromatizarse, se cree que no juega un papel en el desarrollo sexual (Alam *et al.*, 2005).

Al acercarse el periodo reproductivo, se da un incremento en la T plasmática en machos funcionales al igual que un incremento de E2 en hembras funcionales (Chan y Yeung, 1989). Los cambios, a corto plazo, en los niveles sanguíneos de esteroides, asociados con la espermiación y el desove, son similares en los machos de algunas especies de teleósteos (Barry *et al.*, 1990). Al comienzo de la espermiación, los niveles plasmáticos de andrógenos decrecen y hay un incremento en los niveles de $17\alpha,20\beta$ -khydroxy-4-pregnen-3-one ($17,20\beta$ -P) y 17α -hydroxyprogesterona (17-P) (Barry *et al.*, 1990).

Una vez que el ovocito ha crecido totalmente, se vuelve competente para realizar la FOM, la cual incluye el término de la meiosis y la maduración del citoplasma. La FOM es requerida para una fertilización exitosa (King *et al.*, 1994). En respuesta al incremento de los niveles circulantes de una GtH de maduración específica, los folículos ováricos cambian de una producción de E2 y T a una síntesis y secreción de C_{21} "hormona esteroidea" que es referida como MIS que induce la FOM. El decremento de los niveles de E2 y T coincide con el incremento de C_{21} durante FOM (King *et al.*, 1994). El decremento de E2 plasmático sucede antes que el decremento de T plasmático y el E2 puede disminuir hasta niveles casi indetectables en la fase de T substancial (King *et al.*, 1994).

3.2. Hermafroditismo en meros

El hermafroditismo secuencial es una estrategia reproductiva común entre los peces marinos. Los géneros más estudiados han sido los lábridos, serránidos y espáridos (Warner, 1982; Robertson y Justines, 1982). El hermafroditismo o reversión sexual consiste en el cambio de sexo de un individuo funcional hacia otro determinado sexo (Shapiro, 1987a; Shapiro, 1987b). Esta reversión sexual forma parte de la historia de vida de algunas especies y parece ser que ocurre únicamente hacia una sola dirección y en algunas especies de serránidos depende del comportamiento social (Robertson, 1972; Ross *et al.*, 1983). El patrón más común es de hembra hacia macho lo que se conoce como hermafroditismo protogíneo (Warner, 1982).

La mayoría de las especies de meros estudiados han sido descritas como hermafroditas protogíneo secuenciales (Sadovy *et al.*, 1994; Johnson, 1998; Marino *et al.*, 2001; Marino *et al.*, 2003; Devlin y Nagahama, 2002; Lee *et al.*, 2002). Es decir, cambian de hembras a machos cuando se produce esperma durante las fases de juvenil y de hembras. La transformación es completada por la proliferación de las crestas que es acompañada por el desarrollo de senos espermáticos en la pared gonadal (Smith, 1965; Shapiro, 1987). Algunas especies, han sido recientemente catalogadas como gonocóricos con fase bisexual juvenil

como *Epinephelus striatus* (Bloch, 1972) (Sadovy y Colin, 1995) y recientemente la cabrilla sardinera, *M. rosacea* (Erisman *et al.*, 2008).

Existe evidencia histológica del cambio de sexo en algunas especies de meros (Smith, 1965; Abu-Hakima, 1987; McGovern *et al.* 1998; Bhandari, *et al.*, 2003, Erisman *et al.* 2008). Aunque los trabajos mencionados han sido realizados con gónadas de peces obtenidos del medio natural, siendo éstos sacrificados para su posterior análisis histológico. Por lo tanto, los cambios secuenciales de las gónadas durante la transición sexual han sido descritos a partir de distintos organismos (Abu-Hakima, 1987; Bhandari, *et. al.*, 2003).

Para fines de cultivo, la proporción de machos y hembras en los tanques de maduración es un parámetro esencial para la obtención de huevos fertilizados, por lo que el cambio de sexo de los individuos puede tener una repercusión notable sobre la reproducción de individuos en cautiverio (Hong *et al.*, 2006). El cambio de sexo ha sido observado en la cabrilla sardinera en organismos identificados y mantenidos en cautiverio (Gracia-Lopez, comunicación personal), pero no existe evidencia histológica de este cambio, desconociendo además el tiempo requerido para lograr la transformación completa de la gónada y si ocurre durante el periodo reproductivo o fuera de él.

3.2.1. Cambio de sexo

El contexto social a menudo determina la manera en que un individuo va a responder a cierta estimulación modificando su comportamiento. Esto es común en algunas especies de peces hermafroditas protogíneos en donde el cambio de sexo puede ser inducido como consecuencia de interacciones sociales (Robertson, 1972; Ross *et al.*, 1983; Shapiro, 1987a).

La reversión sexual también puede esperarse cuando un individuo de cierto grupo social pueda reproducirse con mayor éxito bajo una condición medioambiental particular que continuar siendo del mismo sexo (Shapiro, 1987a).

3.2.2. Consecuencias del hermafroditismo para la acuicultura

El hermafroditismo tiene una notable repercusión sobre la configuración de los “stocks” de reproductores que son mantenidos en condiciones de cautiverio con fines acuícolas. Sin embargo, la mayoría de los estudios de desarrollo gonadal y de hermafroditismo que han sido realizados con base a observaciones histológicas de las gónadas han sido llevados a cabo con peces silvestres sacrificados donde no es posible observar los cambios secuenciales dentro de la gónada de un individuo dentro de una familia (Smith, 1965; Abu-Hakima, 1987; McGovern *et al.* 1998; Bhandari *et al.*, 2003).

3.2.3. Morfología de las gónadas de organismos hermafroditas

La apariencia de las gónadas de todos los serránidos hermafroditas es similar. Es un órgano par que consiste en un saco hueco que se encuentra por debajo y por detrás de la parte posterior de la vejiga natatoria y conectada a ella por tejido mesentérico. Los órganos derecho e izquierdo son generalmente de distinto tamaño y se encuentran unidos en la parte posterior y se conectan a un oviducto común hacia la región genital por detrás del ano. La pared de la gónada se encuentra cubierta exteriormente por una capa peritoneal compuesta por músculo liso y tejido conectivo.

El tejido testicular de individuos de los hermafroditas serránidos es de tipo ascinoso. El esperma se forma en criptas pequeñas de forma esférica y las células dentro de cada cripta se encuentran en la misma fase de meiosis. Estas criptas se encuentran rodeadas de tejido conjuntivo el cual se rompe cuando el esperma alcanza la madurez. Los individuos en el periodo de pre-desove, tienen algunas criptas que contienen esperma con cola, criptas con espermatogonias y con espermatocitos primarios y secundarios. Después del desove, la mayoría de las criptas se encuentran vacías, pero casi siempre es posible encontrar algo de esperma (Smith, 1965).

3.2.4. Papel de las hormonas en el cambio de sexo

La reversión sexual está acompañada por un cambio en la capacidad esterogénica en la gónada. En la anguila, *Monopterus albus*, la iniciación de la reversión sexual coincide con una proliferación de células de Leydig intersticiales en la fase temprana intersexual (Chan y Yeung, 1989). En los organismos en transición es posible encontrar restos de ovocitos en casi todos los estadios de desarrollo, y además, es posible observar cuerpos atrésicos. En ese estadio, las criptas seminíferas se encuentran proliferando en el epitelio germinal, y una vez que las criptas estén completamente desarrolladas, la gónada se considera testículo, aunque tenga restos de ovocitos (Smith, 1965).

Johnson *et al.* (1998) observan la transición sexual de 5 individuos del mero rojo *Epinephelus morio*, un hermafrodita protogíneo. Tres de ellos, fueron capturados durante la época reproductiva y 2 de éstos tenían ovocitos en el estadio de alveolo cortical en atresia. Los peces identificados como transicionales tardíos (con espermatocitos primarios o espermátidas en la formación del espermiducto) tenían altos niveles de 11-Ketotestosterona (11-KT) ($0.59 \pm 0.08 \text{ ng ml}^{-1}$) y testosterona (T) ($95 \pm 0.68 \text{ ng ml}^{-1}$) y bajos niveles de estradiol (E2) ($0.16 \pm 0.08 \text{ ng ml}^{-1}$) con respecto a los niveles encontrados en las hembras y los niveles de T en los peces en transición fueron similares en machos y hembras, por lo tanto, esta hormona puede no ser responsable de la transición sexual (Johnson *et al.*, 1998).

También se ha demostrado que los andrógenos juegan algún papel en la diferenciación sexual y cambio de sexo en hermafroditas protogíneos (Sadovy *et al.*, 1994; Johnson, 1998; Marino *et al.*, 2001; Marino *et al.*, 2003; Devlin y Nagahama, 2002; Lee *et al.*, 2002). Sin embargo, los andrógenos principalmente la T y la androstenediona parece que tienen un papel menos directo en la producción de hembras. Éstos, han sido relacionados con varios procesos incluyendo la retroalimentación de esteroides del hipotálamo y que funcionan como el sustrato a partir de donde los estrógenos son producidos (Alam *et al.*, 2005). La transformación es completada por la proliferación de las crestas que es acompañada por el desarrollo de senos espermáticos en la pared gonadal (Smith, 1965; Shapiro, 1987). El cambio de sexo puede ocurrir cuando el organismo puede reproducirse con mayor éxito bajo un ambiente determinado o cuando las condiciones sociales favorezcan el cambio (Shapiro, 1987).

El sexo de los peces puede ser controlado induciendo la reversión sexual, así como la esterilidad con la ayuda de esteroides (Billard, 1989). Marino *et al.* (2000), realizan la reversión sexual de hembras de *E. marginatus* mediante el suministro oral de MT. Reportan que las hembras mantenidas en cautiverio alcanzan las etapas finales de maduración, pero que no se observan desoves voluntarios. Sin embargo, las hembras inducidas con GnRH en microesferas producen huevos con unas tasas de fertilización y eclosión elevadas.

4. Reproducción artificial de peces marinos en cautiverio

Las hormonas han sido usadas en la acuicultura para la reproducción, especialmente en la inducción o la sincronización de la ovulación y la estimulación a la espermiación (Billard, 1989). La maduración sexual en condiciones de cautiverio, ha sido estudiada en un gran número de especies de meros y es fundamental para la producción de huevos (Lee y Yang, 2002). Algunos estudios de hembras en cautiverio describen que estas pueden llevar a cabo la vitelogénesis debido a que hay una gran acumulación de HL en la glándula pituitaria pero que hay un fallo en llevar a cabo la FOM lo que causa atresia (A) en los ovocitos al final de la vitelogénesis (Mylonas *et al.*, 1998; Zohar y Mylonas, 2001) que es ocasionada por la falta de producción de la hormona inductora de la maduración (MIH) la cual activa la meiosis y la maduración citoplasmática (Yaron y Sivian, 2006).

Para la reproducción exitosa de la mayoría de peces marinos cultivados en el mundo, es necesario el uso de hormonas exógenas que estimulen la esterogénesis gonadal para inducir o sincronizar la maduración final del ovocito (FOM) y la ovulación (Mylonas y Zohar, 2001). Estos tratamientos son considerados como herramientas confiables que se utilizan para obtener huevos de alta calidad y consecuentemente, un gran número de juveniles (Forniés *et al.*, 2001).

La imposibilidad de los peces en cautiverio de llevar a cabo FOM se piensa que es causado por la falta de liberación de GtH II pituitaria al final de la vitelogénesis. La inyección con el análogo de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRHa) a hembras en cautiverio da como resultado la liberación de GtH II de pituitaria y la iniciación de FOM (Mylonas *et al.*, 1998). Sin embargo, para un protocolo de desove inducido exitoso para muchas especies es necesaria la inyección múltiple de GnRHa a través de las horas, días o semanas (Mylonas *et al.*, 1998).

4.1. Hormonas empleadas para la inducción al desove

La vitelogénesis puede ser inducida en hembras inmaduras a través del tratamiento con hormonas (Ng y Idler, 1983). En la actualidad, se han empleado muchas hormonas o medicamentos (esteroides, prostaglandinas, antiestrógenos) bajo condiciones de laboratorio para la inducción de la ovulación (Billard, 1989). Las primeras experiencias en estudios de teleósteos demostraron que los extractos hipotalámicos de peces estimulaban la liberación de GtH en mamíferos y, a su vez, que los extractos hipotalámicos de mamíferos estimulaban la liberación de gonadotropinas por parte de la pituitaria de los peces. Se demostró además que la LHRH era biológicamente activa en los peces (Zanuy y Carrillo, 1987). Hay varios estudios que revelan la presencia y actividad de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en el hipotálamo de los teleósteos. Lo que

establece que la LHRH sintética puede estimular la liberación de GtH de la pituitaria de los teleósteos (Peter, 1983).

La hormona más comúnmente empleada debido a su disponibilidad, pureza y actividad es la Gonadotropina Coriónica Humana (HCG); que es en ocasiones suministrada en inyecciones para estimular directamente el ovario e inducir la FOM (Kungvankij *et al.*, 1986; Goudie *et al.*, 1992; Watanabe *et al.*, 1995). La HCG de origen mamífero ha sido utilizada a escala comercial para la inducción de la ovulación pero su eficacia es dependiente de la especie. Uno de los efectos adversos de la HCG es que algunas especies pueden desarrollar anticuerpos que pueden resultar en un decremento de la cantidad y calidad de los gametos (Mylonas y Zohar, 2001b). La inyección de HCG favorece el reclutamiento de los ovocitos hacia la vitelogénesis sin importar el estadio en el cual se encuentren (Wallace y Selman, 1981).

La HCG se ha empleado sola o en combinación con extracto de la glándula pituitaria del salmón o de la misma especie. Por esta razón, se han desarrollado análogos hiperactivos de la Hormona Liberadora de Gonadotropina (GnRH), siendo la más común el análogo de la Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante (LHRHa) que es un decapeptido, de vida media muy corta y que se degrada rápidamente por las enzimas existentes. Este puede ser aplicado en inyecciones o en implantes de liberación controlada los cuales controlan la síntesis y liberación de la Gonadotropina (GtH) de la glándula pituitaria de los peces

tratados (Kungvankij *et al.*, 1986; Zohar, 1989; Caddell *et al.*, 1990; Watanabe *et al.*, 1995; Mylonas y Zohar, 2001a,b; Mylonas *et al.*, 2003) e inducen la ovulación (Ritar y Pribadi 2006). Estos análogos sintéticos no producen una respuesta inmune (Mylonas y Zohar, 2001b) y su efecto depende de la especie y de la estructura del análogo (Billard, 1989) son de vida media más larga que el LHRH nativo por lo que son más resistentes a la degradación, su uso se ha expandido rápidamente, aunque la potencia varía de acuerdo a la estructura de los análogos y según la especie receptora (Billard, 1989).

Estudios de los niveles plasmáticos de E2 en *M. saxatilis*, revelan que los niveles de este esteroide incrementan inmediatamente después del tratamiento con GnRH α , alcanzando la mayor concentración antes de la FOM, permanecieron elevados durante la migración de la vesícula germinal y que la T plasmática incrementó gradualmente durante FOM. Los niveles de ambas hormonas decrecieron significativamente alrededor del estadio de migración de la vesícula germinal (GVBD), junto con un gran incremento de los niveles plasmáticos de 17,20 β -P y 17,20 β ,21-P (Mylonas *et al.*, 1998).

4.2. Cuantificación de esteroides sexuales en plasma sanguíneo: Ventajas del uso de Inmuno-Ensayos (EIA)

Inicialmente los ensayos de EIA fueron desarrollados para medir la dosificación y especificidad del anti-suero. Sin embargo, más recientemente su uso ha sido extendido hacia la detección y la cuantificación de varios antígenos incluyendo hormonas de la pituitaria de mamíferos (Kah *et al.*, 1989). Las EIA son ensayos que son reproducibles y sensibles y que satisfacen los criterios de otros ensayos válidos. Entre otra de las ventajas del método, se encuentra de que no requiere radioactividad que generalmente es un factor limitante (Kah *et al.*, 1989) (Tabla 1).

En este trabajo de tesis, se ha seguido el protocolo basado en Mañanós *et al.* (1994), para VTG. Respecto a la sensibilidad de EIA, parece ser que por lo menos es equivalente a RIA para gonadotropinas de peces ya que niveles tan bajos como de 60 pg ml^{-1} pueden ser detectados. (Kah *et al.*, 1989). Además de la mayor ventaja de ser libre de radioactividad y el manejo de desperdicios, este ensayo posee varios aspectos positivos (Kah *et al.*, 1989) como:

1. El procedimiento se puede llevar a cabo en menos de 24 h incluyendo en tiempo de cuenta y el análisis de resultados. Esto es de interés sobre todo en estudios *in vitro* ya que es posible realizar un experimento en 2 días. A diferencia de RIA que toma varios días.

2. No es necesario tener un gran número de muestras.
3. Reducción de costo en equipo y en reactivos.
4. El método permite su automatización.

5. Acuicultura mundial de especies de meros

En la actualidad existe un gran interés por parte de la industria acuícola de producir en cultivos especies de meros (Marino *et al.*, 2003; Gracia-López *et al.*, 2004b; Sarter *et al.*, 2006). La acuicultura mundial de meros, ha incrementado la producción mundial de peces a aproximadamente 50,000 toneladas (FAO, 2002). Dentro de las especies más cultivadas se encuentran el mero grasoso (*Epinephelus tauvina*), el mero aerolado (*Epinephelus areolatus*), el mero de Hong Kong (*Epinephelus akaara*) y el mero punteado (*Epinephelus coioides*). Sin embargo, aún existen ciertas restricciones tecnológicas para la cría de meros en cautiverio como la producción constante de huevos, las bajas tasas de fertilización de huevos obtenidos de reproductores cautivos, y la baja tasa de supervivencia larval. Como ejemplo tenemos al mero *Epinephelus akaara* (Okumura *et al.*, 2002). En algunas ocasiones, los juveniles silvestres son capturados y llevados a granjas de engorde aunque la escasez es un componente limitante (Kungvankij *et al.*, 1986; Lim, 1993). Estas restricciones hacen que la reproducción en cautiverio sea esencial para obtener una producción constante de huevos y larvas para fines productivos.

La economía de China y del sureste asiático principalmente, se ha desarrollado rápidamente durante las últimas dos décadas lo que ha llevado a un incremento en la demanda de peces “vivos” en la región. Los meros son valorados por la gran calidad de su carne y hay una gran demanda en el mercado. Los meros son el grupo más fuertemente explotado en el mercado de peces “vivos” en Asia por lo que ha ocasionado que varias especies sean sobre-explotadas; por lo que ha habido un gran esfuerzo de varias naciones para promover la acuicultura de estas especies con la esperanza de producir una producción más sustentable de meros. Sin embargo, el ciclo completo de la mayoría de las especies de meros no ha sido posible de obtener aunque hay avances significativos en los años recientes. Por este motivo, 2/3 partes de los cultivos de meros involucran la captura y la engorda de semilla silvestre que es conocido como acuicultura basada en la captura “*capture-based aquaculture*” (CBA). Existen por lo menos 16 especies de meros que son cultivados en varios países del sureste asiático dentro de los que se encuentran: Indonesia, Malasia, Filipinas, Taiwán, Tailandia, China, Hong Kong y Vietnam (Sadovy, 2000). El cultivo también se lleva a cabo en India, Sri Lanka, Arabia Saudita, Corea, Australia, el Caribe y el sureste de Estados Unidos.

La semilla de los meros es colectada usando una gran variedad de métodos. Generalmente es artesanal y los pescadores usan una variedad de hábitats artificiales. Algunos de los métodos de colecta de semilla de algunos meros son destructivos lo que resulta en altas mortalidades que incluyen grandes volúmenes de fauna de acompañamiento, y/o causan daños al hábitat de los peces. Otro

problema es que algunos métodos dan como resultado el monopolio de las pesquerías locales. Los métodos destructivos incluyen las mallas de tijeras y “fyke” nets, que en la actualidad han sido prohibidas en algunas áreas. Las tasas de mortalidad después de la captura y transporte no han sido bien documentadas; los estimados después de los primeros 2 meses de la siembra son variables (30–70 por ciento), dependiendo de la calidad de los juveniles, el transporte y la presencia de enfermedades y canibalismo (Pudadera *et al.*, 2002).

JUSTIFICACIÓN

La cabrilla sardinera, como otras especies de meros, se considera una especie de alto valor comercial y muy demandada en los mercados. El avance en el conocimiento de la especie sobretodo en los aspectos reproductivos, son la base para una producción eficiente, y los adelantos que puedan generarse en los aspectos tecnológicos en esta tesis, deben servir directamente a optimizar el cultivo de la misma.

Actualmente, y en base al conocimiento conseguido en la especie de estudio y los antecedentes de investigación en otras especies del mismo grupo de peces de los cuales se pueden transferir sus adelantos tecnológicos de cultivo, podemos establecer algunos interrogantes que son necesarios para continuar la investigación y el desarrollo tecnológico de esta especie. Tal es el caso, en el área de la fisiología de la reproducción, donde existe la falta de un detallado estudio de los niveles hormonales (esteroides sexuales) contenidos en el plasma sanguíneo de los reproductores mantenidos en cautiverio y su relación con la madurez gonadal. Tal conocimiento debe servir para entender el ciclo reproductivo y el comportamiento de los organismos en cautiverio para reunir la información necesaria que debe aportar la solución de interrogantes posibilitando de manera clara incrementar la calidad y cantidad de la progenie de cabrilla sardinera. Los resultados deben dar una continuidad al estudio de la especie complementando los resultados obtenidos anteriormente.

Más allá, debe estudiarse el hecho del cambio de sexo en esta especie, una vez la controversia suscitada entre los textos clásicos sobre la biología y la fisiología de los meros que los señalan como hermafroditas protogínicos, y las nuevas investigaciones que revelan el gonocorismo de algunas especies. De forma que se analizará en cautiverio, el desarrollo de las gónadas por individuo, diferenciando este estudio de la metodología usada en el medio natural (biología reproductiva) donde los ejemplares son sacrificados y no permiten ver la sucesión completa por individuo. Aunque existan las limitaciones impuestas por el cautiverio y las repercusiones e influencias que este representa para la reproducción de los organismos, el estudio intentará demostrar el cambio de sexo, como se produce, el tiempo de cambio, la época de cambio, etc., aportando una nueva visión a los estudios clásicos.

Claro que, dada la relevancia actual que tienen por un lado el cultivo de los meros en el mundo ya sea para dedicar su cultivo al consumo humano y/o para ofrecer producción de juveniles en planes de repoblamiento de especies en peligro de extinción o vulnerables, y mas allá para ofrecer una solución tecnológica que permita mejorar el rendimiento por organismo en cuanto a la producción de huevos, en el caso de las hembras, o de juveniles por organismo, los estudios de optimización de la inducción hormonal servirán para aplicarlos directamente a mejorar este apartado del cultivo.

HIPÓTESIS

Será posible la obtención de desoves de calidad de la cabrilla sardinera, *Mycteroperca rosacea* a partir de hembras silvestres y cautivas inducidas a desovar con HCG y LHRHa. Mediante la inducción al desove con diferentes dosis de LHRHa, será posible determinar si las diferentes dosis inyectadas tendrán el mismo efecto sobre la fecundidad total, el número de huevos viables y porcentaje de fertilización.

Mediante el monitoreo de los niveles de esteroides sexuales, será posible identificar el periodo reproductivo de la cabrilla sardinera mantenida en cautiverio así como los picos donde se encuentre el mayor número de ovocitos en estado vitelogénico para disponer de una herramienta para valorar los distintos tratamientos de manipulación hormonal o ambiental para alterar la época de desove o sincronizar las mismas.

Mediante el monitoreo del estadio de madurez gonadal, será posible identificar peces inmaduros en estadio bisexual, suponiendo que se encontrarán justo antes del inicio del periodo reproductivo.

OBJETIVOS

1. Objetivo general

Aumentar el conocimiento de la biología reproductiva de la cabrilla sardinera, *Mycteroperca rosacea* mantenida en cautiverio mediante la descripción histológica del desarrollo gonadal de individuos muestreados repetidamente, la inducción hormonal de hembras reproductoras para la obtención de la ovulación y la cuantificación del contenido de esteroides sexuales en el plasma sanguíneo para incrementar la calidad y cantidad de la progenie y el desarrollo tecnológico del cultivo de la especie ya sea para fines de producción como alimento o repoblamiento de la especie.

2. Objetivos específicos

Descripción del desarrollo gonadal de la cabrilla sardinera, *Mycteroperca rosacea*, con base en las observaciones histológicas de las gónadas de reproductores monitoreados repetidamente.

Describir y comparar la efectividad de la Gonadotropina Coriónica Humana y el análogo de la Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante en la inducción de la maduración final de los ovocitos, la ovulación y la calidad del desove de reproductores silvestres y cautivos de la cabrilla sardinera, *Mycteroperca rosacea*.

Determinar el ciclo anual de los tres esteroides sexuales comúnmente cuantificados (E2, T y 11-KT) en reproductores mantenidos en cautiverio de la cabrilla sardinera, *Mycteroperca rosacea*. Comparar la relación del desarrollo gonadal y la concentración de esteroides sexuales contenidos en el plasma sanguíneo de reproductores monitoreados mensualmente

MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), localizado en la ciudad de La Paz, Baja California Sur, México. Todos los organismos empleados fueron capturados alrededor de la Isla San José mediante línea y anzuelo utilizando sardina como carnada y diferentes artes de pesca (Gracia-López *et al.*, 2004a). En la embarcación, los organismos fueron mantenidos en contenedores con recambio continuo de agua. Los peces fueron transportados vía terrestre al laboratorio del CIBNOR, en tanques de 500 a 1,000 L y provistos de oxígeno suplementario. Una vez en las instalaciones del CIBNOR, los peces fueron anestesiados con una dosis de 50-100 mg L⁻¹ de triclaína metil-sulfonato (MS-222), marcados en la musculatura dorsal (Spaghetti Floy Tags, WA) y pesados. El sexo de los organismos fue determinado realizando la cateterización, obteniendo una biopsia de la gónada y observando la muestra bajo el microscopio óptico.

Los reproductores fueron introducidos en tanques circulares con un volumen de de 16 m³ con un recubrimiento de *liner* negro. Los tanques estaban provistos de un sistema de recirculación que consta de sedimentador, filtro biológico, ultrafiltros, ultravioleta y enfriadores, con aireación suplementaria (Figura 4). Cada tanque estaba cubierto con una malla de nylon del 80 %. La temperatura (Submersible Temperature Logger, HOBO TidbiT, WI) del agua se mantuvo entre los 19 y 29 °C, la salinidad entre 11 y 13 ppt (refractómetro S/M1II-E, ATAGO CO. LTD.) y el

oxígeno disuelto entre 7.2 y 7.6 mg L⁻¹ (YSI 85, OH). Estos parámetros fueron medidos diariamente. El fotoperiodo fue natural y fue calculado mediante el método descrito por Rodríguez *et al.* (2001). La alimentación fue a saciedad y consistió en sardina, macarela o calamar gigante en días alternos.

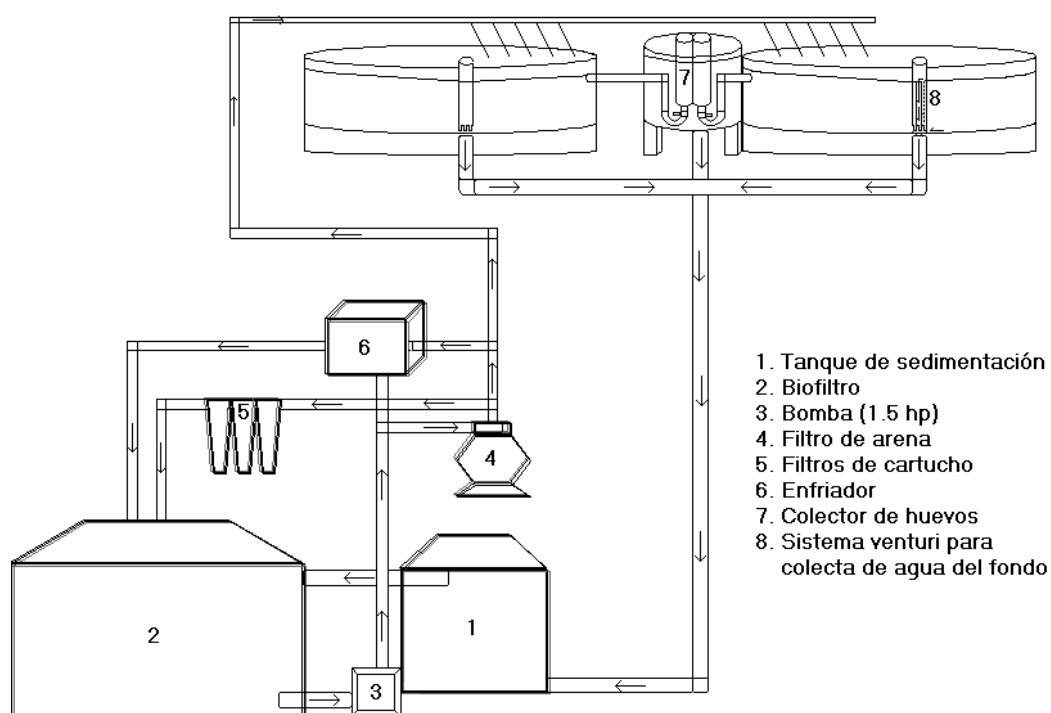


Figura 4. Sistema de recirculación de agua del patio de cultivos del CIBNOR.

1. Descripción del desarrollo gonadal de reproductores de *M. rosacea* mantenidos en cautiverio

1.1. Organismos experimentales

Doce hembras silvestres de cabrilla sardinera fueron capturadas durante junio del 2002. Los peces fueron anestesiados y marcados. Se registró el peso (kg.) y la longitud (cm.) de cada organismo. El peso varió desde 0.32 hasta 0.84 kg. Los peces fueron introducidos en un tanque de entrada de agua de flujo continuo de 16 m³.

1.2. Histología de la gónada

El estudio histológico comenzó en febrero cuando se puede observar los estadios avanzados de gametogénesis dentro del ovario, y duró hasta julio, que es el mes donde se pueden observar ovocitos atrésicos y la ausencia de ovocitos maduros, por lo que este periodo representa el final de la época reproductiva de esta especie mantenida en condiciones de cautiverio (Kiewek-Martínez, 2004).

Mensualmente, los reproductores fueron anestesiados para tomar una parte de la gónada mediante la inserción de una cánula de polietileno en el oviducto (diámetro interno y externo de la cánula: 1.0 y 1.6 mm, respectivamente) (Gracia-López *et*

al., 2004a; Gracia-López *et al.*, 2004b) (Figura 5). A partir de estas muestras se obtuvo el Diámetro Inicial de los Ovocitos (DIO) mediante el análisis de muestras en húmedo en un microscopio compuesto (Olympus Bx -41). Se tomaron microfotografías (Coolsnap-Pro) de al menos 150 ovocitos a los cuales se les midió el diámetro (Sigma Scan 5.0® e Image Pro-Plus® software). Una parte de la muestra fue preservada durante 48 h en solución Karnovsky [glutaraldehído 20 %, sacarosa 40 % y agua filtrada (<1 µm) y esterilizada (UV 40 %)] (Karnovsky, 1965), deshidratada (Thomas y Boyd, 1988), embebida en parafina, seccionada < 5 µm (Leica RM 2125) y teñida con Hematoxilina-Eosina (H-E). Cada una de las laminillas histológicas fue analizada en un microscopio compuesto (Caliolimpus Bx-41) a un aumento de 10× y fotografiada (Image Pro-Plus). Posteriormente se capturaron imágenes con una cámara digital (Coolsnap-Pro) y fueron almacenadas en una computadora utilizando un sistema de imágenes digital (Media Cybernetics) equipado con el software para imágenes Image Pro Plus Software (v.4.5).



Figura 5. Cateterización ovárica de un reproductor de *M. rosacea*

El número promedio de ovocitos analizados por hembra fue de 92 ± 58 en febrero, 151 ± 63 en marzo, 106 ± 28 en abril. En el mes de mayo y junio, solo una hembra tuvo ovocitos en algún grado de desarrollo gonadal. Los ovocitos contenidos en las muestras fueron clasificados dentro de cinco categorías de desarrollo con base a la descripción hecha para peces teleósteos por Kuo *et al.* (1988) y Carrillo *et al.*, (1989) la cual está basada en características morfológicas fácilmente reconocibles como; I. Ovocitos primarios (PV); II. Vitelogénesis Temprana (EV); III. Vitelogénesis tardía (LV); IV. Migración de la vesícula germinal (GVBD) y V. atresia (A). La abundancia relativa de cada tipo celular fue determinada al cuantificar el número total de ovocitos en relación al número total de ovocitos analizados. Los peces en transición sexual o bisexuales (estadio VI) fueron

identificados con base a la descripción hecha para *Epinephelus fario* y los machos mediante la observación de testis en las preparaciones histológicas o por la presencia de esperma fluido al aplicar una ligera presión abdominal (Kuo *et al.* 1998).

La longitud total de los individuos fue calculada mediante la función $y = ax^b$, (y= peso; $a= 1.43 \times 10^{-5}$; x= longitud total; $b= 2.970$) basad en el estudio de peces silvestres de la cabrilla sardinera, *M. rosacea* (Diaz-Urbe *et al.* 2001).

2. Efecto de la HCG y LHRHa sobre la inducción de la maduración final del ovocito, la ovulación y la calidad del desove.

2.1. Organismos experimentales

Entre los años 2001 y 2007, se capturaron un total de 289 individuos de la cabrilla sardinera, *M. rosacea* con la metodología descrita anteriormente. Estos reproductores fueron mantenidos en cautiverio por un mínimo de diez meses antes de realizar cualquier prueba de inducción hormonal a la ovulación y desove a excepción de los reproductores silvestres inducidos el mismo día de la captura.

2.2. Inducción con HCG de peces en cautiverio

Entre los meses de marzo, abril y mayo de 2003 y 2007, se indujo a la ovulación con HCG (CHORULON[®], Intervet international B.V., Boxmeer, Holanda) con dos inyecciones intramusculares dorsales a veintiocho hembras de cabrilla sardinera; la primera inyección con una dosis de 1,000 IU Kg⁻¹, seguida por una segunda inyección 24 h después de 500 IU Kg⁻¹ (Figura 6). Las hembras inducidas fueron introducidas con machos en tanques de 750 L para facilitar su posterior manejo. En el mes de abril de 2003, seis hembras fueron re-inducidas al desove después del primer tratamiento en el mes de marzo.



Figura 6. Inducción hormonal con HCG en la musculatura dorsal de la cabrilla sardinera, *M. rosacea*

2.3. Inducción con HCG de peces silvestres

Para este experimento, se emplearon sesenta y dos hembras silvestres de las cuales 21 fueron capturadas en mayo del 2004 y en el siguiente año se capturaron 16 en abril y 1 en junio. Estas hembras fueron transportadas al laboratorio y treinta y ocho fueron inducidas a la ovulación con HCG con base al grado de desarrollo de los ovocitos el mismo día de su captura y a su llegada al laboratorio con el mismo método descrito anteriormente para las hembras mantenidas en cautiverio (Figura 6).

2.4. Inducción con LHRHa de reproductores en cautiverio

En abril del año 2003, se indujo a la ovulación con LHRHa a cuatro hembras. En el año 2006, cuarenta y dos individuos (34 hembras: 8 machos) fueron introducidos en dos tanques (16 m³). En los meses de marzo y abril, se seleccionó e indujo al desove con LHRHa (des-Gly10, [D-Ala6]-LHRH) a veinticinco hembras que tenían con un DIO > 354. Las hembras fueron divididas en dos grupos experimentales. En el grupo 1, doce hembras fueron inyectadas intra-peritoneal con una dosis de 15 µg Kg⁻¹ (5 µg Kg⁻¹ seguida por 10 µg Kg⁻¹ tres horas después de la primera inyección) y en el grupo 2, trece hembras fueron inducidas con una dosis de 150 µg Kg⁻¹ (50 µg Kg⁻¹ en la primera inyección y 100 µg Kg⁻¹ tres horas después) (Figura 7).



Figura 7 Inducción hormonal intra-peritoneal con LHRHa de la cabrilla sardinera, *M. rosacea*

2.5. Grupo control

Treinta individuos adultos (0.32-3.60 Kg) fueron capturados en mayo de 2004 y mantenidos en cautiverio. Cada mes se obtuvo una muestra gonadal para observar el grado de desarrollo gonadal. Estos peces no fueron inducidos a desovar con HCG o LHRHa para observar si las hembras mantenidas sin tratamiento en cautiverio pueden llevar a cabo la vitelogénesis, el desarrollo final

de los ovocitos (FOM) o desoves voluntarios en los tanques. Los machos fueron analizados para observar la presencia de esperma mediante presión abdominal.

2.6. Determinación del momento de desove y calidad del desove

El momento de realizar el masaje abdominal fue determinado utilizando algunos criterios morfológicos que incluyen, la inflamación del abdomen y la exposición del poro uro-genital. Las hembras con estas características fueron anestesiadas para tomar una muestra de la gónada para observar el grado de desarrollo gonadal. Las hembras con huevos hidratados, transparentes y flotantes fueron masajeadas para obtener el desove (Figura 8). La fertilización se realizó con un *pull* de esperma obtenido de varios machos siguiendo el método en seco. La activación espermática fue con agua de mar estéril a una temperatura entre 25 y 27 °C. Los desoves permanecieron en agua sin turbulencia durante 15 min y después fueron enjuagados con agua de mar esterilizada con UV para la remoción del excedente de esperma. Los desoves individuales fueron colocados dentro de tanques de fibra de vidrio con un volumen de 30 L.



Figura 8. Masaje abdominal para la obtención de desoves de hembras inducidas hormonalmente

La fecundidad total fue estimada mediante el conteo del número total de huevos contenidos en veinte muestras de 25 ml y la tasa de fertilización mediante el registro del número de huevos fertilizados (huevos con divisiones celulares regulares) en al menos 100 huevos dos horas después de la fertilización. Posteriormente, se interrumpió la aireación y los huevos fertilizados (flotantes) fueron separados de los de mala calidad (precipitados). Los huevos fertilizados fueron enjuagados con agua de mar esterilizada, transportados a un laboratorio interno y colocados dentro de tanques de fibra de vidrio de volumen de 500 L. El

diámetro de los huevos fertilizados fue medido a partir de fotografías de 150 huevos mediante la misma técnica descrita para el diámetro inicial.

3. Ciclo anual de los esteroides sexuales (E2, T y 11-KT) y su relación con el desarrollo gonadal

3.1. Organismos experimentales

En mayo del 2004, se capturaron treinta individuos adultos de *M. rosacea* con un peso inicial entre 0.3 y 3.6 Kg y una longitud inicial entre 30 y 64 cm. Los peces fueron introducidos equitativamente en dos tanques de recirculación de 16 m³ para ser mantenidos bajo condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura a excepción del verano de 2005 para evitar estrés térmico, la temperatura del agua fue disminuida cuando ésta excedió los 26 °C.

La edad de los reproductores fue calculada por retro cálculo entre 2.86 y 9.81 años (Diaz-Uribe *et al.*, 2001). Cada mes, los peces fueron anestesiados con 50 mg L⁻¹ de tricaína metil sulfonato, MS222 (Tricaine-S, Western Chemical, WA, EUA) para obtener una muestra de la gónada siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

3.2. Análisis de esteroides sexuales

Después de la cateterización gonadal, se extrajeron 3 ml de sangre de cada uno de los reproductores mediante la inserción de una jeringa heparinizada (Inhepar, Pisa, México) por debajo de la línea lateral en el pedúnculo caudal (Figura 9). El plasma fue separado mediante centrifugación a 2,500 rpm durante 20 min a 4 °C y preservado a -80 °C hasta el análisis de los esteroides. Los machos fueron identificados mediante las marcas, el análisis de las muestras obtenidas por la cateterización gonadal o por la presencia de esperma fluido al aplicar una ligera presión abdominal "*stripping*". En cada muestreo también se registró el peso (Kg.) y la longitud (cm.) de cada organismo.



Figura 9. Extracción de sangre del pedúnculo caudal de la cabrilla sardinera, *M. rosacea*.

3.2. Análisis de esteroides sexuales (EIA)

Las muestras de esteroides sexuales fueron analizadas en el laboratorio de fisiología de peces del Instituto de Acuicultura Torre la Sal (IATS) en Castellón, España. Los niveles plasmáticos de E2 y T ($n = 30 \text{ mes}^{-1}$) fueron determinados mediante inmuno ensayos específicos (EIA) (Rodríguez *et al.*, 2001), y los niveles de 11-KT ($n = 30 \text{ mes}^{-1}$) mediante EIA desarrollado para el esturión siberiano (Cuisset *et al.*, 1994), con la excepción que los anticuerpos primarios se utilizaron en una dilución final de 1:320,000 y que el trazador (Cayman Chemicals, MI, EUA) fue diluido en 1:10 Unidades Ellman (UE ml^{-1}). Las especificaciones de sensibilidad y especificidad del ensayo fueron iguales a las descritas por Rodríguez *et al.* (2001). Los niveles de esteroides sexuales (E2, T, y 11-KT) fueron cuantificados para cada uno de los peces para observar si estos podían ser utilizados como indicadores del sexo y el cambio de sexo, en especial la 11-KT.

3.2.1. Preparación de los buffers y reactivos (Apéndice I).

- Potassium Phosphate Buffer (PPB).
- Reaction Buffer (RB) o Acetilcolinesterasa Buffer (EIA Buffer).
- Buffer de Saturación.
- Buffer de Lavado.
- Reactivo de Ellman (50X).

3.2.2. Recubrimiento de las placas con el anticuerpo monoclonal.

Previo al inicio del ensayo, se recubrieron (“*coating*” de las placas) los pocillos de las placas con el anticuerpo monoclonal, Mouse Monoclonal Ab (Monoclonal anti-rabbit IgG (γ -chain specific) clone RG-96, 2,500 determinaciones, SIGMA). Este fue resuspendido en 5 ml de Potassium Phosphate Buffer (PPB) (Ver Apéndice I) 0.05 M.

Para la preparación de 20 placas, fue necesario preparar 198 ml de PPB 0.05 M. Se añaden 2 ml de Anticuerpo Monoclonal MAB 1 mg ml^{-1} para dar $10 \text{ } \mu\text{l ml}^{-1}$. Se extraen 2.78 ml del PPB y se añade el anticuerpo para hacer 200 ml de MAB a una dilución de 1800. Añadir a las placas $200 \text{ } \mu\text{l pocillo}^{-1}$ de esta disolución del anticuerpo a 10 placas, y se deja a temperatura ambiente toda la noche. Se recupera el anticuerpo y se añaden $300 \text{ } \mu\text{l pocillo}^{-1}$ de RB.

Se añaden $200 \text{ } \mu\text{l pocillo}^{-1}$ del anticuerpo recuperado a otras 10 placas y se deja a temperatura ambiente durante la noche. Sin quitar el anticuerpo de estas últimas 10 placas se añadieron $100 \text{ } \mu\text{l pocillo}^{-1}$ de Buffer de Saturación. Se guardan las placas a $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ selladas con parafilm y en oscuridad.

3.2.3. Extracción de plasma con metanol para el análisis de esteroides

Para el análisis de los esteroides sexuales, es necesaria la extracción del plasma con metanol. Primero se realizó la extracción del plasma para la T y la 11-KT. En tubos de 1.5 ml se diluyó el plasma (1:16) con RB, obteniendo 100 µl de plasma diluido. Se añadieron 500 µl de metanol y se centrifugó a 4,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se recogió el sobrenadante en tubos nuevos y se realizan 2 extracciones mas añadiendo 250 µl de metanol. Se recogió el sobrenadante y fue mezclado con los anteriores y secado en estufa a 40 °C. Las muestras fueron resuspendidas en 500 µl de RB (obteniendo una dilución final de 1:80 que es la dilución de trabajo) y congeladas a -20 °C hasta su utilización.

La extracción del plasma para el análisis del E2 es similar, variando únicamente la dilución ya que este esteroide se trabaja más concentrado. Se utilizaron 60 µl de plasma puro a los cuales se realizó el mismo procedimiento de extracción que se menciona anteriormente. Cuando las muestras estuvieron secas, se resuspendieron en 120 µl de RB y se congelaron hasta su utilización. La dilución final de trabajo fue 1:2.

3.2.4. Preparación de la placa para el análisis de esteroides sexuales

Testosterona

Es necesario en un principio preparar la curva estándar que consiste en 10 pocillos con cantidades conocidas de T, en cantidades decrecientes y en un rango de 5 ng ml^{-1} a $0.0097 \text{ ng}^{-1}\text{ml}$. Se utilizó el stock de T que poseen en el Instituto de Acuicultura de Torre la Sal el cual se encuentra a $1,000 \text{ ng ml}^{-1}$. Se marcaron 10 tubos (1-10) a los cuales se agregó 250 μl de RB a excepción del tubo 1. El tubo con el estándar 1, se encuentra en una concentración de 5 ng ml^{-1} y se extraen 250 μl y se agregan al estándar 2 y así progresivamente hasta terminar la curva estándar en el tubo 10 donde habrá 500 μl .

Se prepara el trazador (Testosterona AChE Tracer, 500 determinaciones, Cayman Chemical Company el cual se resuspende en 3 ml de RB. El stock se encuentra en alícuotas de 250 μl a 10 UE y la unidad de trabajo requerida es de 0.5 UE.

Después se procedió a preparar la placa. Se tomaron las placas con *coating* y se lavaron 3 veces con el tampón de lavado o "*washing buffer*". Se secaron las placas invirtiéndolas y dando golpes contra una toalla absorbente. Se agregaron 100 μl de RB en NSB, 50 μl de RB en Bo, 50 μl de Std en los sitios de la curva, 50 μl de RB en IE, 50 μl de P (muestras), 50 μl de Trazador) en todos excepto en N y AT.

Guardar 50 μl de Tr a 4 °C en un tubo eppendorff y taparlo bien, 50 μl de Anticuerpo (Ab) (de preparación casera en el Instituto de Acuicultura Torre de la Sal) en todos excepto en N, AT y NSB. Se dejaron las placas a 4 °C y en agitación suave durante la noche. Se lavaron 3 veces con el *washing buffer* y se añadieron 5 μl de trazador en AT. Se añadieron 200 μl del reactivo de Ellman en todos los pocillos. Se mantienen las placas en oscuridad y se revelaron durante 4 horas a 20 °C en el incubador. Las placas se leyeron en un lector de placas a 405 nm en agitación constante durante 5 segundos.

11-Ketotestosterona

Para la 11-KT también se preparó una curva estándar pero en este caso es de 12 puntos y en un rango desde 1 ng ml^{-1} a 0.00049 ng ml^{-1} (el stock de 11-KT se encontraba a 100 ng ml^{-1}).

Se preparó el trazador (11-KT 500 det SPIBIO) el cual fue resuspendido en 5 ml de RB dando una dilución 1:6. El stock se encuentra en alícuotas de 250 μl a 10 UE y la unidad de trabajo requerida es de 0.5 UE. A continuación las placas fueron montadas como ha sido descrito anteriormente.

Estradiol

Para la E2 también se preparó una curva estándar de 12 puntos y en un rango desde 80 ng ml⁻¹ a 0.0390 ng ml⁻¹ (el stock de E2 se encontraba a 100 ng ml⁻¹).

Se preparó el trazador (Estradiol AChE Tracer, 500 determinaciones Cayman Chemical Company) el cual fue resuspendido en 2 ml de RB. El stock se encuentra en alícuotas de 75 µl a 7 UE que es la unidad de trabajo. A continuación las placas fueron montadas como ha sido descrito anteriormente con la excepción de que se dejan incubando durante la noche en una estufa a 37 °C y después del lavado del día siguiente se revelan durante 2 horas a 20 °C en el incubador.

4. Análisis estadísticos

Los resultados son presentados como promedio ± sd a excepción de los datos de la concentración de esteroides sexuales que se presentan como promedio ± ES. Los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguidos por una prueba de rangos múltiples y rango crítico de Duncan (P< 0.05). Las categorías de desarrollo dentro del ovario son expresadas como porcentajes. Los resultados fueron analizados con el programa para windows Statistica v. 5.5 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA) Los gráficos fueron ilustrados mediante

el programa Sigma Plot para Windows, version 8.0 (1986-2001 SPSS, Chicago, IL, USA).

RESULTADOS

1. Descripción del desarrollo gonadal de reproductores de *M. rosacea* mantenidos en cautiverio

El peso de los reproductores durante el estudio varió de 0.34 a 1.00 Kg (Figura 10).

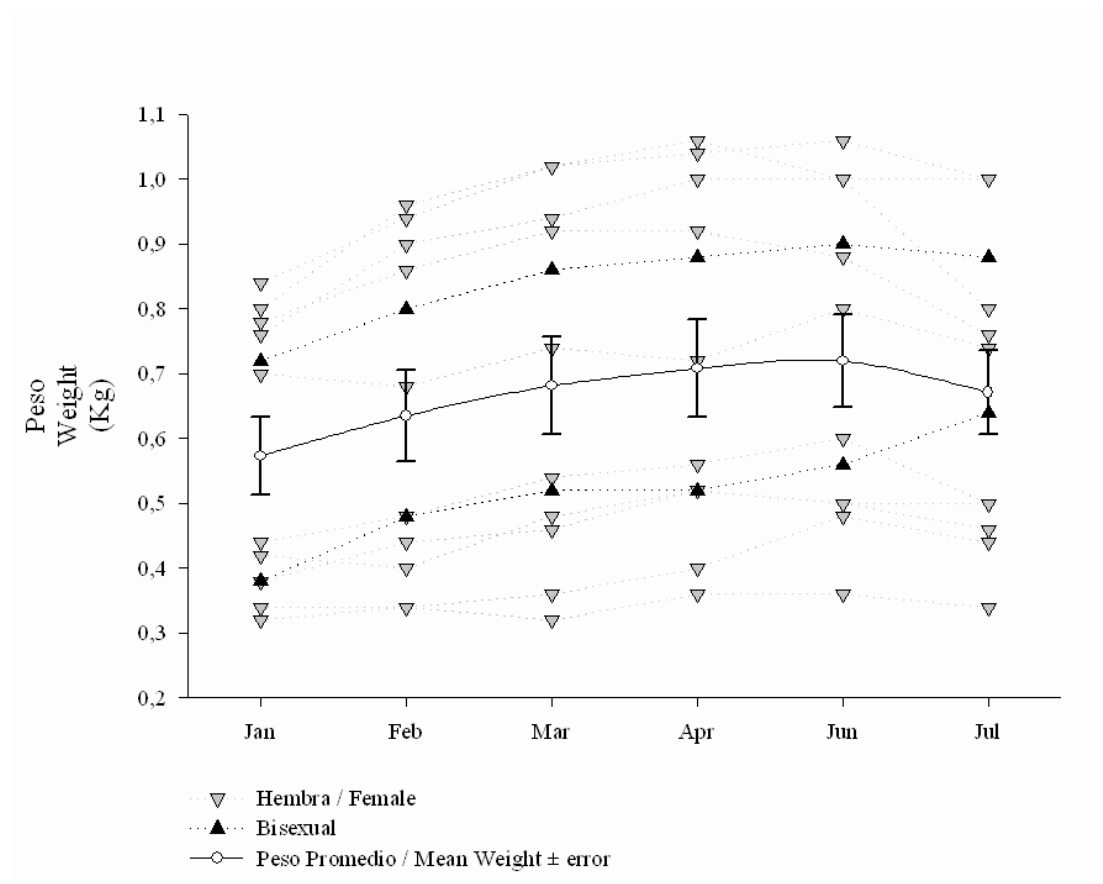


Figura 10. Peso de los reproductores de cabrilla sardinera, *Myxodus rosacea* mantenidos en cautiverio de enero a julio de 2003.

La descripción de los diferentes estadios de desarrollo ovárico, el diámetro de los ovocitos y del núcleo de cada uno de los estadios de desarrollo se muestra en la tabla I. Los ovocitos en crecimiento primario fueron los abundantes a lo largo del estudio (66–90%). En febrero, se observó un incremento en el porcentaje de ovocitos en vitelogénesis temprana (7%) y en abril, cercano al periodo de desove, el porcentaje de ovocitos en crecimiento primario decrecieron y se observó un incremento de los porcentajes de ovocitos en otros estadios de desarrollo ovárico vitelogénesis temprana, vitelogénesis tardía y ovulados incrementó a 12, 7 y 6%, respectivamente (Tabla I; Figura 12).

Tabla I Desarrollo gonadal de hembras mantenidas en cautiverio de la cabrilla sardinera *M. rosacea*.

Categoría	Estadio de desarrollo	Descripción	DO RO DN RN (μm)*
I. Crecimiento Primario	Núcleo de Cromatina	Núcleo central y gran nucléolo rodeados de una capa delgada de citoplasma sin inclusiones vitelinas. Ovo plasma basófilo (Figura 4a).	65 \pm 3 30 - 114 27 \pm 6 11 - 52
	Perinucleolar	Múltiples nucléolos en la periferia interior del núcleo. Ovo plasma menos basófilo, sin inclusiones citoplasmáticas. Las células foliculares forman una capa delgada. La membrana folicular como una capa sencilla de 3-4 células planas rodeando cada uno de los ovocitos (Figura 4b).	
II. Vitelogénesis Temprana	Alveolo Cortical	La vitelogenina comienza a incorporarse dentro del ovocito. Se observan pequeñas gotas lipídicas y alvéolos corticales dispersos en el ovo plasma (Figura 4c).	127 \pm 28 79 - 219 47 \pm 14 19 - 97
	Vesícula de Vitelo	Se aprecian pequeñas vesículas de vitelo en la región periférica del citoplasma. La <i>zona radiata</i> es evidente y más delgada que la de los ovocitos vitelogénicos (Fig. 4D).	
	Vitelo	Las vesículas de vitelo incrementan en tamaño y llenan el ovo plasma. Se observan claramente las capas de la granulosa y de la teca. Así como la <i>zona radiata</i> (Figura 4E).	
III. Vitelogénesis Tardía	Migración del Núcleo	Evento asociado con la maduración final del ovocito (FOM). El núcleo comienza a migrar desde el centro hacia el polo animal. Los lípidos y el vitelo se fusionan y la gota lipídica se comienza a concentrar en el centro del ovocito. Se pueden observar los alveolos corticales en la periferia del ovo plasma los cuales incrementan en tamaño (Figura 4F).	307 \pm 58 180 - 473 79 \pm 12 44 - 97
	Rompimiento de Vesícula Germinal (GVBD)	Después de la migración, el núcleo se rompe y vierte su contenido hacia el citoplasma del polo animal. Los cromosomas se alinean en el centro de la célula, se completa la primera división meiótica y se libera el primer cuerpo polar. Inicia la segunda división meiótica y se queda en latencia para ser completada en la fertilización.	
IV. Ovulación	Madurez ⁺⁺	Comienza la hidratación al final de la maduración justo antes de la ovulación. Los lípidos se fusionan formando una única gota lipídica. Las vesículas de vitelo se encuentran completamente fusionadas formando una masa continua de fluido. Este proceso le concede transparencia y flotabilidad al huevo aumentando su tamaño debido a la gran incorporación de agua. El huevo hidratado es completamente homogéneo y finamente granular (Figura 4G)	369 \pm 48 239 - 488 89 \pm 12 51 - 116
V. Atresia	Atresia	Comienza la fagocitosis de las células de la granulosa después del rompimiento de la <i>zona radiata</i> . Desorganización de la capa de células foliculares y se reemplaza por tejido conjuntivo. El núcleo y los glóbulos de vitelo se desintegran. Este estadio es evidente durante el periodo de post-desove aunque puede ser observado a lo largo del desarrollo (Figura 4H).	176 \pm 59 69 - 377 69 - 377 x

DO= diámetro del ovocito (media \pm sd); RO= Rango (min-máx); DN= Diámetro del núcleo (media \pm sd); RN= Rango del núcleo (min-máx).

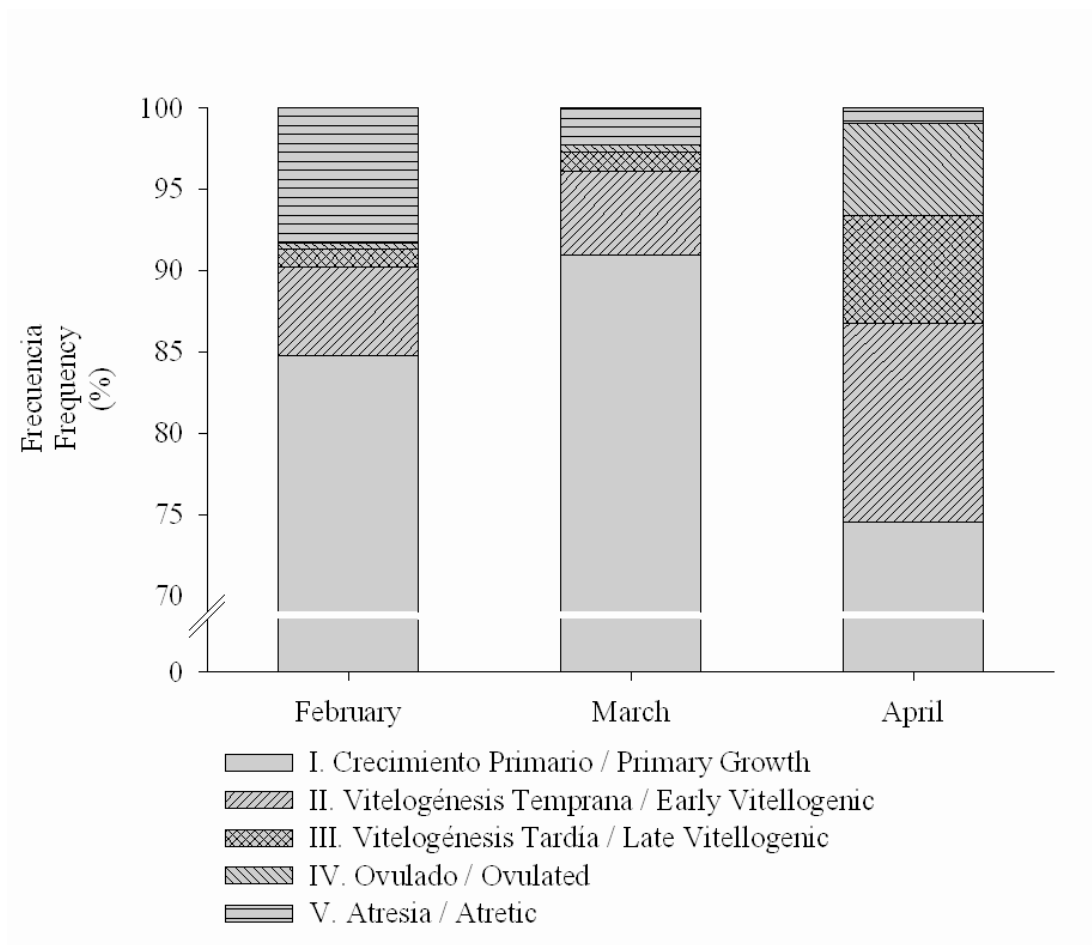


Figura 11. Distribución de los estadios de desarrollo ovárico de los reproductores de *Mycteroperca rosacea* en cautiverio.

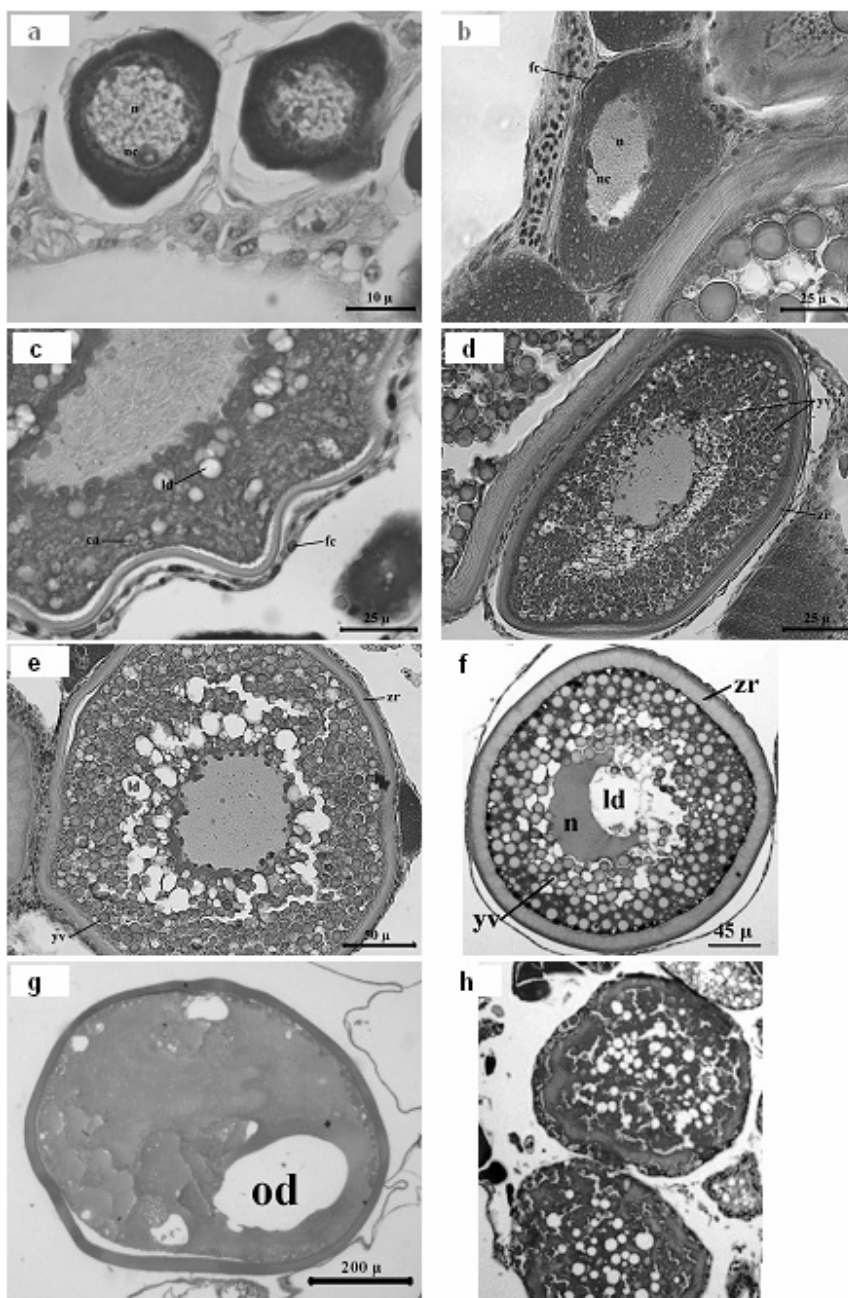


Figura 12. Estadios de desarrollo ovárico de la cabrilla sardinera, (*M. rosacea*) mantenida en cautiverio.

I. Crecimiento primario a); Núcleo de cromatina (100x). b); Perinucleolar (40x). II. Vitelogénesis temprana c); Alveolo cortical (60x), d); Inclusiones vitelinas (20x), e); Vitelogénicos (20x). III. Vitelogénesis tardía f); Migración del núcleo (10x). IV. Ovulación g); Maduro (4x). V. Atresia h); Atresia (10x). ca = alveolo cortical, fc =

célula folicular, ld = inclusiones lipídicas, n = núcleo, nc = nucleolo, od = gota lipídica, yv = vesícula de vitelo, zr = zona radiata.

En febrero, diez hembras tenían ovocitos en crecimiento primario y dos hembras tenían ovocitos en todos los estadios de desarrollo incluyendo atresia. En marzo, las dos hembras que tenían los estadios de desarrollo más avanzados se hallaban en transición sexual. El resto de los reproductores seguían siendo hembras. En abril, no hubo más individuos en estadio de transición y esta proporción sexual se mantuvo a lo largo del año (Tabla II). En marzo cuando fueron observados los peces en transición el peso de los reproductores fue de 0.52 y 0.86 Kg (Figura 10).

Tabla II. Distribución sexual de *M. rosacea* en cautiverio durante 2003.

Mes	Hembra	Bisexual	Macho
Febrero	12	0	0
Marzo	10	2	2
Abril	10	0	2
Junio	10	0	2
Julio	10	0	2

Los individuos en transición sexual poseían ovarios con estadios de desarrollo avanzados en febrero (Figura 13A) que se caracterizaban principalmente por poseer ovocitos en crecimiento primario en el estadio peri-nucleolar 74%, vitelogénesis temprana 9%, Vitelogénesis tardía 2%, ovulados 1% y atresia 14%.

En marzo, el análisis de las preparaciones histológicas reveló la presencia de ovotestis (Figura 13B). El estadio de transición se caracterizó por la presencia de ovocitos en crecimiento primario en el estadio perinucleolar, seguido por la degeneración de los ovocitos primarios y la proliferación de espermatogonias, espermatocitos y espermatozoos con cauda (Figura 5B,C). En este estadio, las criptas diferenciadas de los machos proliferaron hacia el interior de la lamela mientras los ovocitos primarios se degeneraron y fueron reabsorbidos.

Los machos se caracterizaron por la presencia de espermatogénesis. Un gran número de espermatogonias, espermatocitos, espermátidas y espermatozoos fueron observados en los testículos en el mes de abril (Figura 13C).

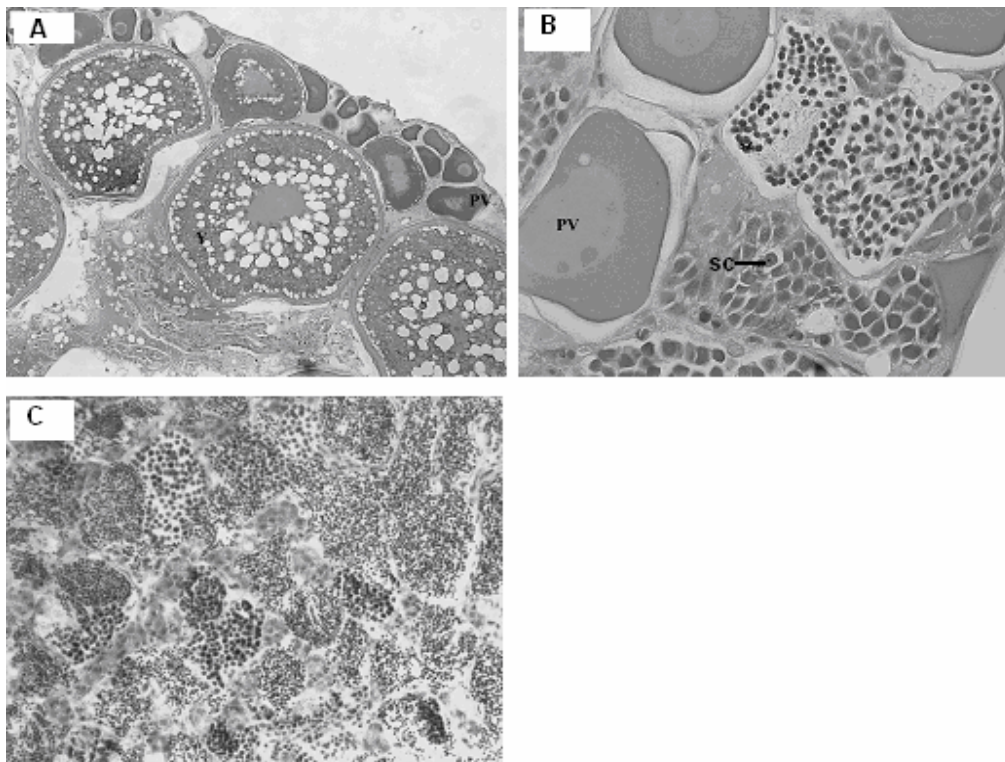


Figura 13 Gónada de la cabrilla sardinera *M. rosacea* en estadio de transición sexual.

A; Ovario de individuo en transición en febrero (20x). B; Ovo-testis en marzo (100x). C; Testis de macho transformado en abril (40x). PV = ovocito primario; Y = ovocito vitelogénico; SC = espermatocito.

2. Efecto de la HCG y LHRHa sobre la inducción de la maduración final del ovocito, la ovulación y la calidad del desove.

2.1. Proporción sexual

El número total de peces estudiados fue 289, siendo 187 (65 %) hembras y 102 (35 %) machos. La proporción sexual fue 1.8 hembras: 1.0 machos y el % de machos y hembras dentro de todas las categorías de peso fue al menos de 28.9 % en relación con el total (Tabla III).

Tabla III. Número total de reproductores de *M. rosacea* y proporción sexual de los peces en cada categoría de peso.

Categoría de Peso (Kg)	Total (n)	Hembra (%)	Macho (%)	Individuos / Categoría (%)
0.00 - 0.50	54	56	44	19
0.51 - 1.00	136	70	30	47
1.10 - 1.50	38	71	29	13
1.51 - 2.00	23	65	35	8
2.10 - 2.50	14	57	43	5
2.51 - 3.00	5	60	40	2
3.10 - 3.50	3	67	33	1
3.51 - 4.00	9	44	56	3
4.10 - 6.00	7	43	57	2

2.2. Desarrollo gonadal

El análisis de las muestras histológicas demostró que en noviembre las hembras poseen una elevada proporción de ovocitos primarios (> 95 %), donde el 16 % de las hembras examinadas tuvo ovocitos en vitelogénesis temprana. Los estadios avanzados de maduración gonadal (i.e. EV, LV y GVBD) se relacionaron con el incremento del tamaño de los ovocitos de febrero a abril. El diámetro medio de los ovocitos decreció a partir de mayo y se pudo observar una mayor proporción de ovocitos atrésicos en julio. Los diámetros histológicos de los ovocitos en cada categoría fueron: ovocitos primarios $65 \pm 13 \mu\text{m}$, vitelogénesis temprana $127 \pm 28 \mu\text{m}$, vitelogénesis tardía $307 \pm 58 \mu\text{m}$ y $369 \pm 48 \mu\text{m}$ para GVBD.

En algunas hembras, la vitelogénesis comenzó con el fotoperiodo cercano al solsticio de invierno (11L: 13D) y la temperatura por debajo de los 23 °C. En noviembre, tres hembras tuvieron una proporción de 1.7-4.1 % ovocitos en vitelogénesis temprana y en febrero, dos hembras 5.1 % de ovocitos en vitelogénesis temprana, 6.1 % vitelogénesis tardía y 3.6 % de ovocitos atrésicos. Todas las hembras mostraron algún grado de desarrollo ovárico en marzo. Las hembras que presentaron ovocitos en vitelogénesis temprana en el mes de noviembre, alcanzaron el mayor grado de desarrollo ovárico en febrero y marzo. Tres hembras que tuvieron bajas proporciones de ovocitos vitelogénicos en marzo (0-4 %) se desarrollaron en abril (47.3 % ovocitos vitelogénicos) y en julio, las

hembras tuvieron 69.3 % de ovocitos primarios, 1.5 % vitelogénesis temprana y 29.2 % atresia (Figura 14).

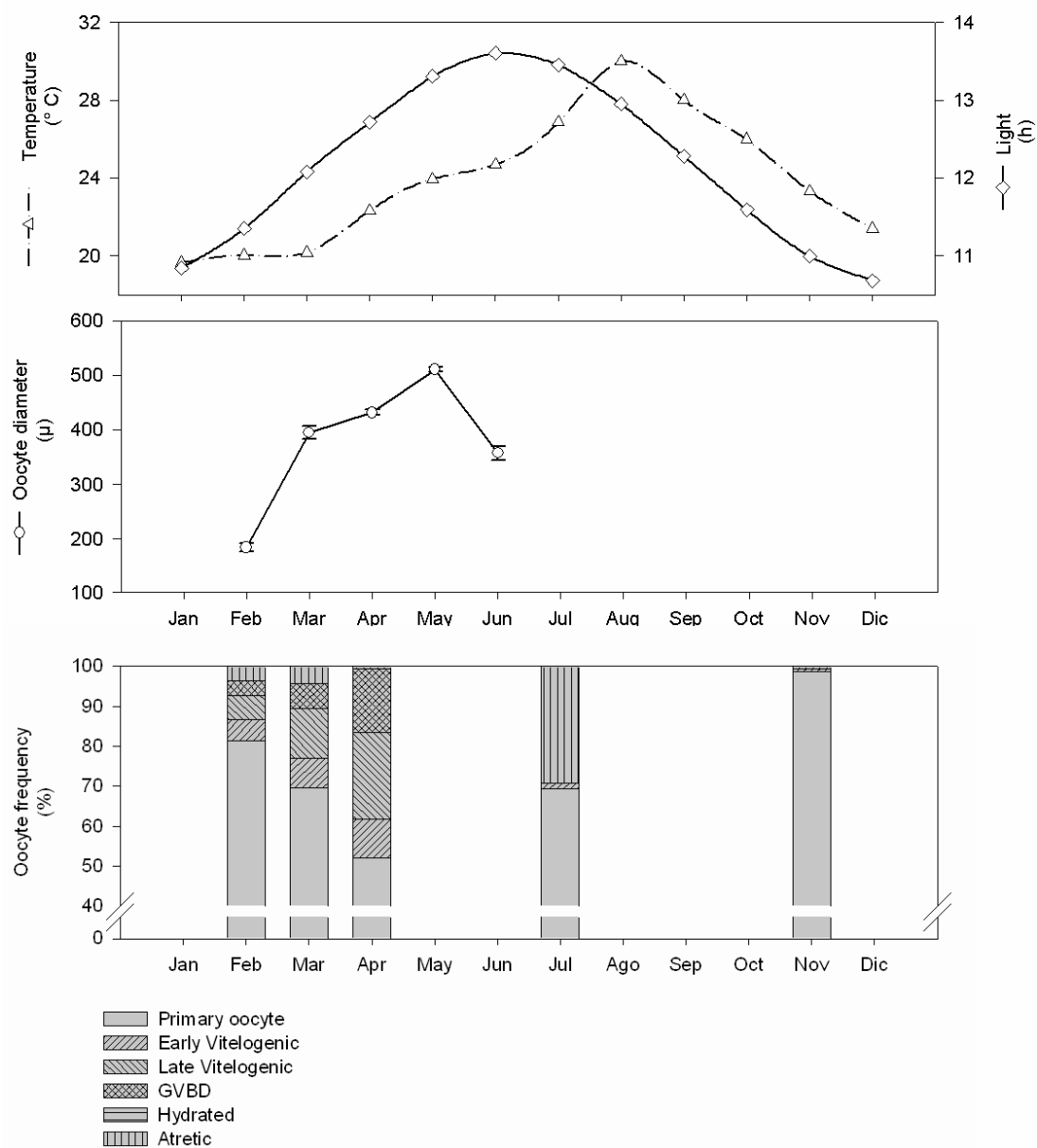


Figura 14. Variaciones mensuales del fotoperiodo y temperatura. Cambio en el tamaño del diámetro medio de los ovocitos y abundancia relativa de los diferentes estadios de maduración de hembras reproductoras de *M. rosacea* mantenidas en cautiverio.

El incremento en la proporción de los estadios avanzados de maduración se relacionó con el incremento de las horas de luz y de la temperatura. Los huevos ovulados fueron observados en bajas proporciones en febrero para después incrementar hacia la mayor proporción en junio. En el mes de julio se pudo observar la mayor proporción de ovocitos atrésicos, sugiriendo que en esta latitud, el periodo de desoves dura de febrero a junio (Figura 14C).

2.3. Inducción con HCG y calidad del desove

Grupo 1. Inducción con HCG de hembras en cautiverio. En marzo siete hembras (0.8-1.8 Kg) con ovocitos de diámetro inicial de $453 \pm 99 \mu\text{m}$ fueron inducidas al desove, y seis respondieron al tratamiento. Los huevos fueron obtenidos mediante masaje abdominal, después de 36 horas tras la primera inyección. La fecundidad obtenida varió de 94×10^3 a 356×10^3 huevos con una tasa de fertilización del 44 al 100 % (Tabla IV). La hembra que no respondió al tratamiento hormonal poseía, en el momento de la inducción, ovocitos con diámetro de $278 \pm 124 \mu\text{m}$. En abril, tres hembras (0.78-1.68 Kg) con DIO $402 \pm 50 \mu\text{m}$ fueron seleccionadas para la inducción hormonal. Dos hembras respondieron 37 a 44 horas después de la primera inyección obteniendo una fecundidad de 55 a 164×10^3 huevos. Solo un desove fue fertilizado artificialmente (98 %) y la hembra que no desovó tenía un DIO de $373 \pm 50 \mu\text{m}$ (Tabla IV).

En mayo, seis hembras que fueron previamente inducidas el mes de marzo fueron inducidas de nuevo. Cinco respondieron positivamente a la inducción con una fecundidad de 40 a 323×10^3 huevos. La tasa de fertilización obtenida fue del 3 al 74 % y la tasa de eclosión entre 30 y 95 %. El diámetro promedio de los huevos fertilizados fue de $871 \pm 14 \mu\text{m}$.

Cuatro machos maduros (1.2 a 2.4 Kg) con presencia de espermatozoides fueron utilizados para fertilizar los huevos obtenidos de las inducciones. La fecundidad acumulada de las hembras inducidas a desovar en más de una ocasión fue de 134 a 400×10^3 huevos con un promedio de $294 \pm 112 \times 10^3$ huevos. El peso de las hembras no se relacionó con la fecundidad ($r^2 < 0.1$).

Tres hembras inducidas en abril de 2005 desovaron con una fecundidad de 15 a 98×10^3 huevos.

En el mes de marzo de 2006, siete hembras (DIO $>400 \mu\text{m}$) fueron inducidas con HCG. De cinco de ellas se obtuvieron de 10 a 90×10^3 huevos pero la tasa de fertilización fue del 0 %. En abril y mayo, cuatro hembras (DIO $473 \pm 64 \mu\text{m}$) fueron inducidas y desovaron de 210 a 570×10^3 huevos con una tasa de fertilización del 30 al 89 %. En marzo de 2007, cuatro hembras desovaron de 121 a 410×10^3 huevos con una tasa de fertilización de 75 a 94 %.

En resumen, el 85 % de las hembras mantenidas en cautiverio inducidas a desovar con HCG respondieron al tratamiento, desovando un promedio de 173×10^3 huevos por hembra. Se obtuvieron un total $3,027 \times 10^3$ huevos viables del 59 % de las hembras inducidas con un promedio de 151×10^3 huevos viables por hembra y con una tasa de fertilización promedio de 68 % (Tabla IV).

Tabla IV. Resumen de las inducciones al desove con HCG de hembras de la cabrilla sardinera, *M. rosacea* mantenidas en cautiverio.

Fecha de Inducción (mm-aa)	Hembras Inducidas / Desoves (n)	T (C)	Peso (media \pm sd) (kg)	DIO (media \pm sd) (μ m)	Fecundidad Total ^a (media \pm sd) ($\times 10^3$)	Huevos Viables ^a ($\times 10^3$)	Tasa de Fertilización ^a (%)
03-03	7 / 6	22	1.10 \pm 0.36	453 \pm 99	220 \pm 113	42–296	44–100
04-03	3 / 2	22.5	1.13 \pm 0.48	402 \pm 50	110 \pm 77	0–54	0–98
05-03 ⁺	6 / 5	23.5	1.05 \pm 0.33	509 \pm 30	147 \pm 116	1–139	3–74
04-05	3 / 3	23	0.66 \pm 0.02	446 \pm 69	43 \pm 48	0	0
03-06	7 / 5	23	0.67 \pm 0.11	>400	27 \pm 35	0	0
04-06	3 / 3	24	2.85 \pm 1.55	636 \pm 204	432 \pm 152	174–235	31–89
05-06	1 / 1	24	4.40 \pm 0.00	989 \pm 97	210	63	30
03-07	4 / 4	22	1.75 \pm 0.48	>400	246 \pm 136	114–365	75–94
TOTAL					5,027	3,027	

Grupo 2. Inducción con HCG de hembras silvestres. Treinta y ocho hembras silvestres (0.24 a 3.14 Kg) fueron inducidas a desovar el mismo día de su captura. Un total de 84 % de las hembras desovó un promedio de 91×10^3 huevos por hembra. Cinco hembras desovaron huevos viables (13 %) en abril con una tasa promedio de fertilización de 8 ± 22 % (Tabla V).

Tabla V. Resumen de las hembras silvestres de *M. rosacea* inducidas a desovar con HCG

Fecha de Inducción (mm-aa)	Hembras Inducidas / Desoves (n)	Peso (media \pm sd) (kg)	DIO Rango (media \pm sd) (μ m)	Fecundidad Total ^a ($\times 10^3$)	Huevos Viables ^a ($\times 10^3$)	Tasa de Fertilización ^a (%)
05-04	21 / 15	0.99 \pm 0.52	542 \pm 154	94 \pm 86	0	0
04-05	16 / 16	0.95 \pm 0.54	430 \pm 60	65 \pm 66	0–158	0–79
06-05	1 / 1	0.50 \pm 0.00	>400	220 \pm 00	0	0
TOTAL				2,678	255	

DIO = Diámetro Inicial del Ovocito.

^aDatos de hembras con desoves.

2.4. Inducción con LHRHa y calidad del desove

Grupo 3. Inducción con 20 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de LHRHa. En marzo, 8 hembras respondieron positivamente al tratamiento (67 %) y también se observaron dos desoves voluntarios. Tres de las doce hembras inducidas en marzo fueron re-inducidas en abril pero ninguna tuvo huevos viables. La fecundidad total varió de 8 a 254×10^3 huevos con un número total de huevos desovados de 806×10^3 . Cuatro hembras tuvieron huevos viables (33 %) con una tasa de fertilización de 3 a 99 % (Tabla VI). Las dos hembras que tuvieron la mayor tasa de fertilización (50 y 99 %) tuvieron un DIO $>500 \mu\text{m}$. Las hembras que no desovaron tuvieron el menor DIO en el momento de la inducción ($354\text{-}410 \mu\text{m}$) (Tabla VI).

Grupo 4. Inducción con 150 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de LHRHa. Trece hembras fueron inducidas al desove con LHRHa con una dosis total de $150 \mu\text{g Kg}^{-1}$. Cuatro hembras que fueron inducidas en abril fueron re-inducidas con la misma dosis en mayo. En abril, nueve hembras desovaron con masaje abdominal. La fecundidad total fue variable, con un rango de 4 a 332×10^3 huevos, y la fecundidad acumulada fue de 928×10^3 huevos. Seis de las nueve hembras inducidas tuvieron huevos viables con una tasa de fertilización de 1 a 41 % (Tabla VI). El número de huevos viables varió de 50 a 60×10^3 .

En resumen, de las veinticinco hembras que fueron inducidas al desove con LHRHa, se lograron 17 desoves mediante masaje abdominal (68 %) obteniendo un total de $1,813 \times 10^3$, de los cuales 376×10^3 fueron huevos viables (Tabla VI). También se consiguieron dos desoves voluntarios, con 79,000 huevos, aunque no hubo evidencia si estos desoves eran de la misma hembra o de varias.

Tabla VI. Resumen de los resultados de las inducciones al desove con LHRHa en hembras cautivas de *M. rosacea*

Fecha de Inducción (mm-aa)	Dosis de LHRHa (mg kg ⁻¹)	Hembras Inducidas / Desoves obtenidos (n)	T (°C)	Peso (media ± sd) (kg)	DIO (media ± sd) (µm)	Fecundidad Total ^a (media ± sd) (×10 ³)	Huevos Viables ^a (×10 ³)	Tasa de Fertilización ^a (%)	Inducciones ^b (n)	Desoves ^b (n)
03-06	5 + 15	12 / 8	24	1.02 ± 0.31	488 ± 115	101 ± 82	0–81	0–99	15	15
04-06	50 + 100	13 / 9	24.5	0.91 ± 0.42	513 ± 106	103 ± 108	0–60	0–41	17	16
Desoves Voluntarios (2) ^c						40 ± 49				
TOTAL						1,813	376		32	31

IOD = Diámetro Inicial de Ovocito.

^aDatos de hembras desovadas.

^bNúmero total de inducciones, algunas hembras fueron inducidas en más de una ocasión y desovaron varias veces.

^cDos desoves voluntarios dentro del tanque sin fertilización. No fue posible localizar a la hembra que desovó.

2.5. Grupo control

Grupo 5. Control. Las hembras del grupo control (n=16) tuvieron una proporción elevada de ovocitos primarios a lo largo del estudio. En enero, se pudo observar ovocitos en vitelogénesis temprana y los estadios avanzados de desarrollo incrementaron progresivamente en los meses siguientes similares a lo observado en las hembras de los otros grupos experimentales. Las gónadas entraron en el periodo de post-desove en el mes de julio junto con un decremento de los estadios más avanzados de maduración y un incremento de los estadios gonadales inmaduros. Las hembras del grupo control, no presentaron FOM ni desoves voluntarios dentro de los tanques. Los machos del grupo control maduraron y se pudo observar esperma fluyente al aplicar una ligera presión abdominal.

2.6. Diferencias entre los tratamientos

Las hembras del grupo 1, tuvieron la mayor fecundidad promedio ($P < 0.05$) siendo diferente de los dos grupos de LHRHa y similar al grupo 2 (HCG silvestre). Este grupo también tuvo el mayor número de huevos viables y la mayor tasa de fertilización al compararlo con el resto de los tratamientos ($P < 0.05$). El número promedio de huevos por hembra del grupo 1 que desovó huevos viables fue de 104×10^3 , más del doble que el resto de los tratamientos. Hubo una mayor proporción de hembras con huevos viables en todos los grupos con hembras en

cautiverio (33-59 %). Únicamente 13 % de las hembras silvestres inducidas desovaron huevos con una baja tasa de fertilización (8 ± 22) (Tabla VII).

Las hembras pertenecientes al grupo 1 que no respondieron al tratamiento tuvieron un DIO de $393 \pm 84 \mu\text{m}$ en el momento de la primera inducción. El diámetro promedio de los ovocitos de las hembras de este grupo que desovó fue de $487 \pm 138 \mu\text{m}$ y finalmente el DIO de las hembras que produjeron huevos viables fertilizados incrementó hasta alcanzar $523 \pm 154 \mu\text{m}$. En el grupo 2, el DIO de las hembras que no desovaron fue mayor que el de el grupo de hembras en cautiverio ($532 \pm 167 \mu\text{m}$); se observaron valores similares de las hembras que desovaron ($488 \pm 125 \mu\text{m}$) y las que tuvieron huevos viables ($514 \pm 70 \mu\text{m}$) (Tabla VII).

En los tratamientos con LHRHa, las hembras pertenecientes al grupo 3 que no desovaron, tuvieron un DIO de $379 \pm 25 \mu\text{m}$, menor a las hembras del grupo 4 ($516 \pm 33 \mu\text{m}$). Las hembras que desovaron tuvieron un DIO de 543 ± 102 y $473 \pm 166 \mu\text{m}$, respectivamente. El DIO de las hembras que desovaron huevos viables fue alrededor $500 \mu\text{m}$ (Tabla VII).

Tabla VII Resumen de los resultados de las inducciones hormonales de *M. rosacea* de los diferentes tratamientos experimentales

Tratamiento	Hembras Inducidas / Desoves (n)	DIO* NS S VE ($\mu\text{m} \pm \text{sd}$)	Hembras Desovadas (%)	Fecundidad Total ($\times 10^3$)	Huevos Viables ($\times 10^3$)	Tasa de Fertilización (%)
Grupo 1	28 / 29	393 \pm 84 487 \pm 138 523 \pm 154	85	5,027 ^a	3,027 ^a	40 \pm 40 ^a
Grupo 2	38 / 32	532 \pm 167 488 \pm 125 514 \pm 70 379 \pm 25	84	2,681 ^{a,b}	255 ^b	8 \pm 22 ^b
Grupo 3	12 / 8	543 \pm 102 501 \pm 59 516 \pm 33	67	807 ^b	189 ^b	14 \pm 31 ^b
Grupo 4	13 / 9	473 \pm 166 498 \pm 187	69	928 ^b	187 ^b	18 \pm 31 ^b

* DIO promedio de hembras inducidas. NS= Hembras sin desove; S= Hembras con desove; VE= Hembras con huevos viables. Letras diferentes representan diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).

3. Relación entre la concentración de esteroides sexuales y el desarrollo gonadal de reproductores de *M. rosacea*

3.1. Hembras

3.1.1. Desarrollo gonadal

Las hembras tuvieron un mayor porcentaje de ovocitos primarios a lo largo del periodo experimental (I; >76%) (Figura 15A). Los ovocitos primarios fueron predominantes de enero a febrero (> 85 %) donde podemos observar una pequeña proporción de ovocitos vitelogénicos (< 3.3 %). En enero, se pudieron observar ovocitos en vitelogénesis temprana (1.5%). En los siguientes meses, el porcentaje de peces con ovocitos en vitelogénesis temprana y tardía incrementó progresivamente siendo en marzo donde se encontraron huevos ovulados y coincidió con el incremento en la temperatura del agua y el fotoperiodo (Figura 15A,D). En los meses siguientes la proporción de huevos ovulados incrementó hasta llegar al valor más elevado en junio (ver área sombreada (Figura 15). En julio, las gónadas entran en el periodo de post-desove caracterizado por el incremento en la cantidad de ovocitos previtelogénicos (> 95%) y atrésicos (0.52%). En este mes, la temperatura del agua alcanzó los 26 °C y el fotoperiodo fue de 13.4 h. Aunque un pequeño número de ovocitos atrésicos fue observado durante todo el año (< 1%) (Figura 15).

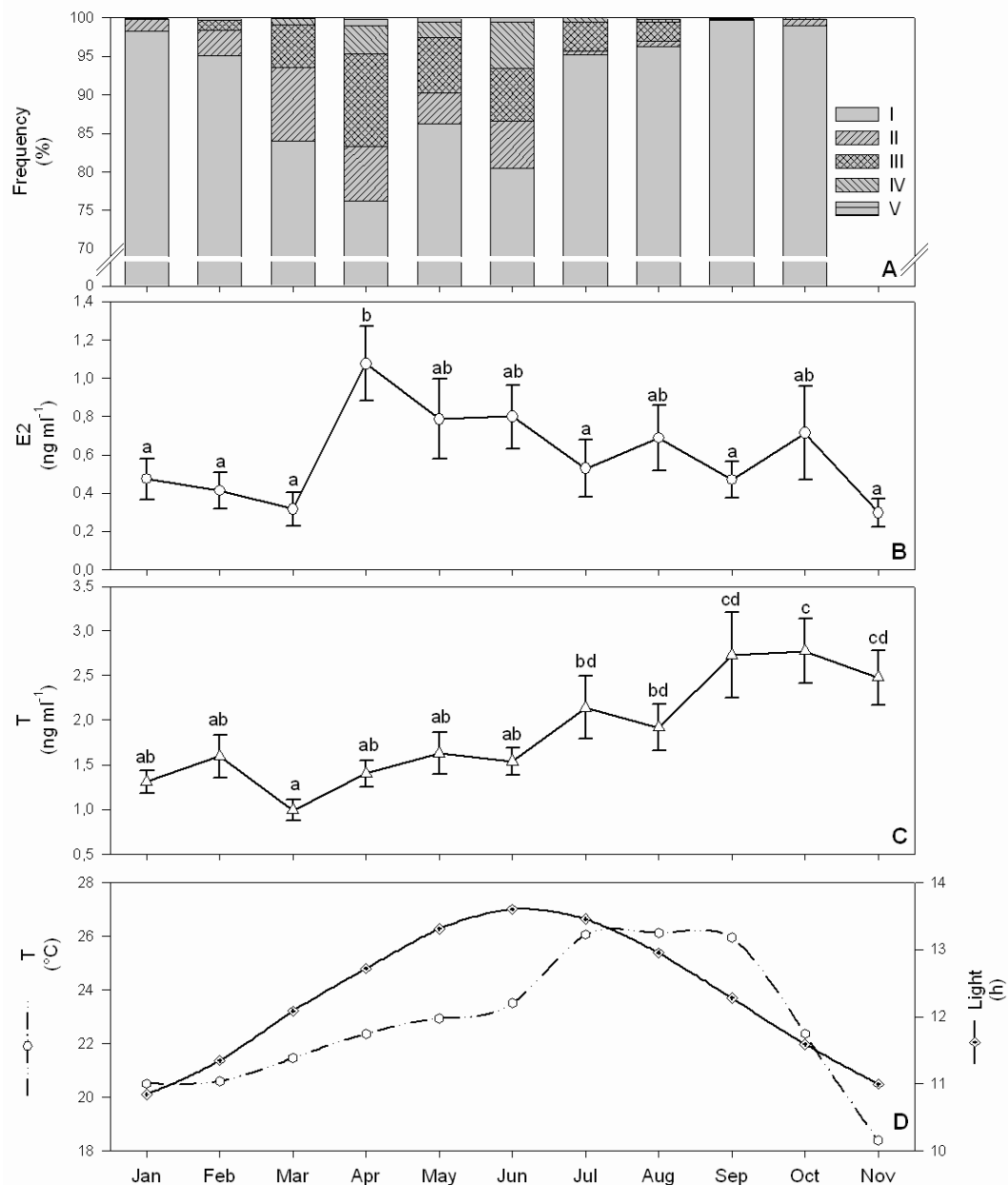


Figura 15. Variaciones mensuales de los estadios gonadales, niveles plasmáticos de Estradiol (E2), testosterona (T) y los cambios medioambientales de la temperatura y fotoperiodo de hembras reproductoras de la cabrilla sardinera, *M. rosacea* en cautiverio.

Los valores mensuales de los esteroides sexuales se encuentran expresados como promedio \pm SE. ($n = 16 \text{ mes}^{-1}$). Letras diferentes representan diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre los meses de la misma hormona. El área sombreada indica los valores $< 76\%$ de ovocitos primarios.

La recrudescencia gonadal en la cabrilla sardinera fue relevante cuando el porcentaje de ovocitos en categoría I decreció hasta valores $< 84\%$ durante el mes de marzo (Figura 15A). La temperatura del agua en ese mes era $> 21.4 \text{ }^\circ\text{C}$ y el fotoperiodo incrementó por 1 hora con respecto al mes anterior, hasta alcanzar 12 h de luz en el mes de marzo (Figura 15E). A partir de marzo hasta junio, las gónadas de las hembras se desarrollaron, observándose mayor proporción de los estadios más avanzados de maduración, los cuales coincidieron con un pequeño y constante incremento en la temperatura del agua, la cual alcanzó $23.5 \text{ }^\circ\text{C}$ en junio. En este momento se puede observar el fotoperiodo más elevado (13.6 h).

3.1.2. Concentración de esteroides sexuales de hembras

Estradiol

Se observaron bajos valores de E2 de noviembre a marzo ($0.19 - 0.47 \text{ ng ml}^{-1}$) y un incremento significativo (~ 4 -veces) en el mes de abril alcanzando la mayor concentración del año y que coincidió con la recrudescencia gonadal, siendo el valor más elevado del ciclo reproductivo ($1.08 \pm 0.19 \text{ ng ml}^{-1}$). Los valores de E2 permanecieron elevados y casi constantes ($\sim 0.8 \text{ ng ml}^{-1}$) en mayo y junio. A partir

de julio hasta octubre, los valores en la concentración de E2 disminuyeron (~ 0.53 ng ml⁻¹), siendo significativamente menor a la concentración de abril. Posteriormente se observó otro decremento hasta llegar a una concentración basal en el mes de noviembre (Figura 15B).

Testosterona

Los niveles de T se mantuvieron sin cambios y bajos desde enero y se mantuvo sin cambios estadísticos significativos hasta mayo en donde la concentración incrementó ligeramente, manteniéndose en este nivel desde junio hasta noviembre. En los meses siguientes, se observó un incremento constante hasta un pico en octubre en el periodo de post-desove (Figura 15C). Durante el periodo de post-desove, la T incrementó constantemente alcanzando la concentración más elevada en septiembre y octubre (Figura 15C). Este incremento coincidió con la disminución del fotoperiodo y los niveles de E2.

11-Ketotestosterona

La concentración de 11-KT se mantuvo constante a lo largo del año con valores de 0.14 ± 0.02 ng ml⁻¹ y 1.13 ± 0.55 ng ml⁻¹. No se obtuvieron diferencias significativas de los valores de la concentración al comparar los diferentes meses.

Los niveles de 11-KT se mantuvieron bajos a lo largo del estudio ($< 1.1 \text{ ng ml}^{-1}$), por lo que los resultados fueron excluidos de la figura para evitar confusión.

3.2. Machos

3.2.1. Concentración de esteroides sexuales en machos

Estradiol

Se observó un patrón bimodal de patrones bajos de los niveles de E2 ($< 0.9 \text{ ng ml}^{-1}$) en machos a lo largo del ciclo sexual. Los niveles fueron los más elevados durante el periodo de gametogénesis en enero y al final del periodo reproductivo de junio a julio. En los meses de enero y febrero, los niveles plasmáticos de E2 fueron $0.67 \pm 0.15 \text{ ng ml}^{-1}$ y $0.41 \pm 0.10 \text{ ng ml}^{-1}$, respectivamente. Se observó un decremento constante y significativo en marzo en relación con enero. En abril, comienza a incrementar la concentración de E2 hasta un pico en los meses de junio y julio. Para posteriormente decrecer significativamente durante los siguientes meses.

Testosterona

Los niveles plasmáticos de T no variaron a través del año. Únicamente se observó una tendencia a incrementar a partir de abril ($1.4 \pm 0.17 \text{ ng ml}^{-1}$) a julio ($1.88 \pm 0.75 \text{ ng ml}^{-1}$) (Figura 16B).

11-Ketotestosterona

Los niveles plasmáticos de 11-KT se mantuvieron sin cambios significativos en una concentración de $0.21 \text{ ng ml}^{-1} \pm 0.05$ y $0.40 \pm 0.16 \text{ ng ml}^{-1}$ desde enero hasta febrero ($<0.4 \text{ ng ml}^{-1}$) e incrementaron continuamente a partir de marzo hasta alcanzar un pico en junio y julio (2.24 y 2.68 ng ml^{-1} , respectivamente). Los valores más altos de 11-KT coincidieron con los porcentajes más elevados de machos en espermiación (Figura 16C). Esta concentración fue significativamente más elevada que la concentración de los meses de enero y febrero. A partir de agosto hasta noviembre se pudo observar un decremento significativo el cual coincidió con el periodo de post-desove (Figura 16C). El incremento de los niveles plasmáticos de E2 y 11-KT durante el periodo reproductivo, coincide con el incremento de la temperatura del agua y el fotoperiodo creciente del verano (Figure 16D).

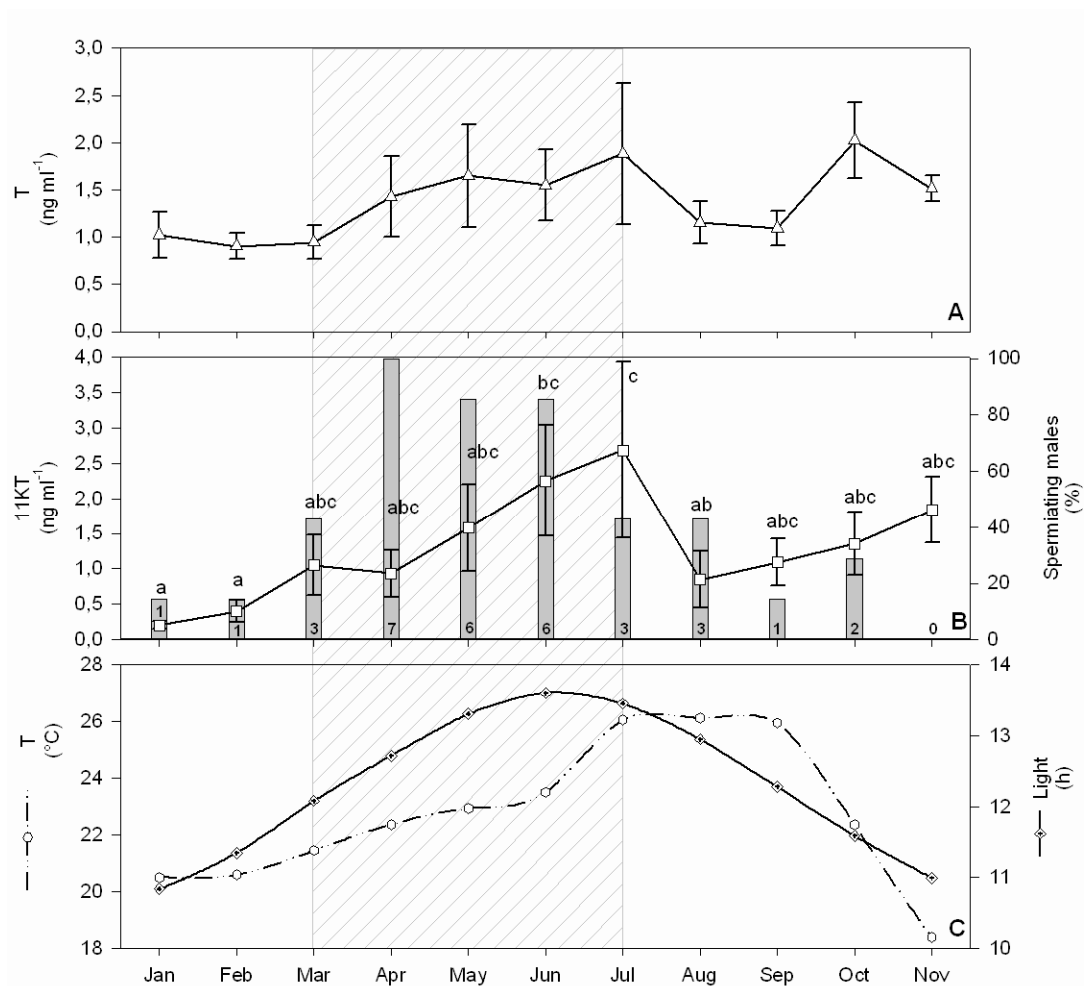


Figura 16. Variación mensual de los niveles plasmáticos de testosterona (T), 11-ketotestosterona (11-KT) y el porcentaje de machos en espermiación

(C; barras). Valores medioambientales de la temperatura y el fotoperiodo. Los valores mensuales de la concentración de esteroides sexuales son expresados como promedio \pm SE ($n = 7 \text{ mes}^{-1}$). Letras diferentes representan diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los meses para la misma hormona. El área sombreada incluye valores de 11-KT plasmáticos superiores a 0.5 ng ml^{-1} .

3.3. Concentración de esteroides sexuales en peces bisexuales

3.3.1. Desarrollo gonadal

Durante el periodo experimental, una de las hembras (0.66 kg y 37 cm) se encontró en estadio bisexual y se transformó a macho. Al igual que el resto de las hembras, se pudo observar una mayor proporción de ovocitos primarios a lo largo del año. En el mes de abril, las frecuencias de las categorías de desarrollo fueron: I; 90.5%, II; 2.6%, y III; 4.2%. A diferencia de las otras hembras, en este mes no se observaron ovocitos hidratados y un valor de 2.6% de ovocitos atrésicos. En agosto, no se observaron más ovocitos dentro de la gónada y se pudo observar distintos estadios espermáticos dentro del nuevo fluyente al aplicar una ligera presión abdominal. Para el siguiente periodo reproductivo, en abril del 2006, se observó esperma fluyente (Figura 17).

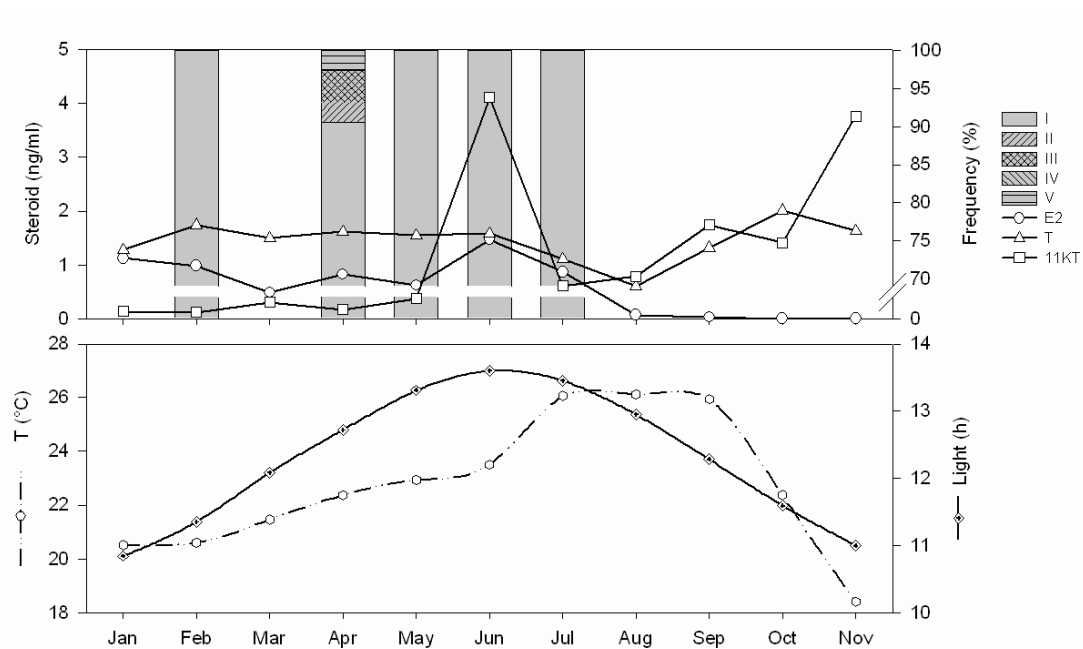


Figura 17. Desarrollo gonadal del individuo bisexual y los niveles plasmáticos de esteroides sexuales durante el periodo experimental.

Estradiol (E2 -○-); testosterona (T -▼-). 11-ketotestosterona (KT -□-).

3.3.2. Concentración de esteroides sexuales en el cambio de sexo

Estradiol

La concentración de E2 se mantuvo relativamente elevada durante los primeros meses del periodo experimental, desde enero a julio con valores de concentración entre 0.48 ng ml^{-1} y 1.47 ng ml^{-1} . En el mes de junio, se pudo observar la mayor concentración de E2 coincidiendo con el fotoperiodo más elevado. A partir de

agosto se observaron niveles bajos de E2 ($0 - 0.06 \text{ ng ml}^{-1}$) hasta el final del periodo experimental (Figura 17).

Testosterona

La T fue elevada ($1.21-1.74 \text{ ng ml}^{-1}$) desde enero hasta junio y comenzó a decrecer hasta el mes de agosto (0.60 ng ml^{-1}), para después incrementar continuamente desde septiembre hasta noviembre ($1.32-2.01 \text{ ng ml}^{-1}$) (Figura 17).

11-Ketotestosterona

Los niveles plasmáticos de 11-KT se mantuvieron bajos hasta mayo con una concentración entre 0.12 y 0.37 ng ml^{-1} . En el mes de junio, se observó un incremento agudo hasta alcanzar la máxima concentración (4.12 ng ml^{-1}), la cual estuvo en relación con el fotoperiodo. La concentración disminuyó en julio (0.61 ng ml^{-1}) y se pudieron observar dos incrementos posteriores, el primero en septiembre (1.74 ng ml^{-1}) y el segundo en noviembre (3.76 ng ml^{-1}) (Figura 17). El segundo incremento ocurrió cuando la temperatura y el fotoperiodo eran bajos (Figura 17).

En el apéndice II se muestran los resultados de los esteroides sexuales durante el estudio.

DISCUSIÓN

1. Descripción del desarrollo gonadal de reproductores de *M. rosacea* mantenidos en cautiverio

En este estudio, se describieron los cambios que ocurrieron en las gónadas de la cabrilla sardinera *M. rosacea*, en un ciclo anual, a través de técnicas histológicas, y se demuestra que la totalidad de reproductores que se mantuvieron en cautiverio, maduraron sexualmente. Al igual que lo observado en la naturaleza, los reproductores presentan las fases más avanzadas de madurez a partir de abril hasta junio (Erisman *et al.*, 2008). Los estadios de vitelogénesis tardía pueden ser observados a partir de febrero indicando el progreso de la madurez gonadal y en abril se obtienen los porcentajes más elevados de ovocitos en estadios avanzados de vitelogénesis y por lo tanto el mayor diámetro medio de los ovocitos. Este periodo reproductivo, es común para otras especies de meros como *Epinephelus tauvina* (Forsskal, 1772) (Abu-Hakima, 1987), *Epinephelus septemfasciatus* (Bhandari *et al.*, 2004a) y similar a *E. merra* con el mayor desarrollo ovárico en junio (Lee *et al.*, 2002). Lo que indica la fuerte influencia del fotoperiodo y la temperatura en el desarrollo gonadal de estas especies tropicales. La talla mínima en la que se observó madurez gonadal fue 360 mm, que significa una edad 3+ años; esto coincide con la edad mínima donde se encontró madurez gonadal en *E. tauvina* (Abu-Hakima, 1987).

Recientemente, fue demostrado que los individuos silvestres de la cabrilla sardinera, *M. rosacea* son gonocoristas pasando por una fase juvenil bisexual sin el desarrollo de ovarios maduros en tallas menores a 220 mm (2 años) (Erisman *et al.*, 2008). En este estudio los dos individuos que cambiaron de sexo eran mayores de 3 y 4 años (351 y 416 mm, respectivamente) y tuvieron ovarios maduros con todos los estadios de desarrollo un mes previo a la reversión sexual. Existen algunas especies de meros donde los individuos más grandes son los que cambian de sexo, aunque en otras especies puede ser observado en organismos de tallas pequeñas como es el caso de *Epinephelus tauvina* (Forsskal, 1772) (Abu-Hakima, 1987), *Epinephelus aeneus* (Geoffroy Saint-Hilaire, 1817) (Hassin *et al.*, 1997) y *Epinephelus merra* (Bloch, 1793) (Bhandari *et al.*, 2003). Sin embargo, por lo general, el tamaño promedio de las hembras es menor que el tamaño promedio de los machos de una población, a diferencia de *M. rosacea* donde en este estudio se demostró que el tamaño de las hembras y los machos se traslapó.

Los organismos de *M. rosacea* de este estudio, cambiaron de sexo a macho tras ocho meses en cautiverio. El cambio de sexo, es decir la transformación completa de la gónada de hembra a gónada masculina, se realizó en un periodo menor a dos meses. Estos individuos tenían ovarios maduros con todos los estadios avanzados de desarrollo ovocitario en el mes de febrero, un mes después se observó la ovo-testis con reminiscencias de tejido ovárico previo la presencia de esperma y la transformación completa hacia la gónada masculina funcional en marzo. El tiempo que tarda un individuo en cautiverio en cambiar de sexo varía de

acuerdo a la especie, el mero *E. coloides* demoró 7 años en cambiar de sexo en cautiverio (Yeh *et al.*, 2003). La velocidad del cambio de sexo también puede verse afectada por el cautiverio, ya que es común que en las poblaciones silvestres, ocurra fuera del periodo reproductivo (Smith, 1965; Bruslé y Bruslé, 1975; McGovern *et al.*, 1998; Bhandari *et al.*, 2003; Bhandari *et al.*, 2004a). En estudios del mero *E. merra* en cautiverio, la reversión sexual fue completada en un periodo más corto en la época reproductiva, siendo relacionado con los altos niveles de esteroides sexuales generados durante este periodo (Alam *et al.*, 2005; Alam *et al.*, 2006).

En algunas especies, la unidad social está comprendida por varios individuos pequeños y un macho grande dominante, que cuando desaparece o no puede mantener el control de sus subordinados, una de las hembras mas grandes puede cambiar de sexo y asumir el papel del macho (Yaron y Sivan, 2005). En este estudio los individuos que sufrieron reversión sexual no fueron los más grandes demostrando el potencial de la especie de cambiar de sexo sin relación con el tamaño. Esto ha sido reportado en otros meros en cautiverio como *E. akaara* donde el tamaño de las hembras que sufren la reversión sexual es diferente al encontrado en poblaciones silvestres (Tanaka *et al.*, 1990), y para el mero *E. striatus*, que es una especie descrita como gonocorista con el potencial de cambiar de sexo bajo condiciones naturales o controladas (Sadovy y Colin, 1995). Existen otras especies que han sido caracterizadas como gonocoristas en la naturaleza como *Bostrichthys sinensis* (Lacepède, 1801) pero en condiciones de

cultivo el 10-15 % de los peces son hermafroditas, sugiriendo también que el hermafroditismo es el resultado de las condiciones de cautiverio como puede ser la elevada temperatura o químicos que se introducen en los estanques (Hong *et al.*, 2006). También, algunas especies de meros como *Epinephelus marginatus*, *E. coioides* y *E. merra* han sido inducidas hormonalmente al cambio de sexo con metiltestosterona (MT), mezclas de hormonas o inhibidores de la aromatasa (Glamuzina *et al.*, 1998; Yeh *et al.*, 2003; Bhandari *et al.*, 2004a; Bhandari *et al.*, 2004b; Bhandari *et al.*, 2005; Alam *et al.*, 2006, respectivamente) para obtener mayor producción de esperma. La inducción a la reversión sexual de individuos adultos de *E. merra* con inhibidores de aromatasa produjo machos en dos meses y medio con testis mayores que los machos silvestres y con una gran producción de esperma y alta fertilización de huevos (Bhandari *et al.*, 2004b; 2005); aunque juveniles de *E. merra* inducidos a la reversión sexual produjo individuos con poca producción de esperma, sugiriendo que el éxito de la reversión sexual podría depender del tamaño y la edad de los individuos (Robertson y Justines, 1982; Glamuzina *et al.*, 1998; Candi *et al.*, 2004).

En este estudio, todos los individuos fueron muestreados repetidamente y mantenidos en condiciones de cautiverio como lo sugerido por Bhandari *et al.*, (2003), por lo que los resultados mostrados aquí pertenecen a un mismo individuo. Estos resultados, en conjunto, son de suma importancia para considerarlos en la composición del stock de reproductores con fines de producción en acuicultura. Se requieren más estudios acerca del comportamiento reproductivo de las hembras y

machos en cautiverio, junto con pruebas de inducción a la reversión sexual para corroborar el comportamiento reproductivo de la cabrilla sardinera en cautiverio.

2. Efecto de la HCG y LHRHa sobre la inducción de la maduración final del ovocito, la ovulación y la calidad del desove.

Este estudio demostró que la inducción hormonal con HCG o LHRHa es una herramienta eficaz para la reproducción de la cabrilla sardinera (*M. rosacea*). Se obtuvieron un total de $9,100 \times 10^3$ huevos de hembras inducidas al desove de los cuales $3,658 \times 10^3$ fueron huevos viables, aunque los resultados de fecundidad, número total de huevos viables y tasa de fertilización variaron entre los diferentes tratamientos.

La inducción hormonal con HCG para producir la maduración final de los ovocitos ha sido utilizada ampliamente en un gran número de especies con dosis que van desde 100 a 4000 IU/Kg (Tucker 1998; Zohar y Mylonas 2001). Dentro de estas especies se encuentran el mero rayado (*E. amblycephalus*) inducido con 1-3 inyecciones de 1000 IU/Kg, con desoves de 25 a 30 h después de la primera inyección (Tseng y Poon, 1983), el mero de Hong Kong (*E. akaara*), inducido con 2 inyecciones de 1000 a 2000 IU Kg⁻¹ (Tseng y Ho, 1988), el mero del coral "squaretail" (*Plectropomus areolatus*) inducido con 350-700 IU Kg⁻¹ y el mero marrón (*E. fuscoguttatus*) inducido con una dosis de 150 a 700 IU Kg⁻¹ (Tucker y

Fitzgerald, 1994; Kohno *et al.*, 1990). Otras dos especies del género como el “gag” (*Mycteroperca microlepis*) inducido con una dosis de 870 UI Kg⁻¹ ó 1500 UI Kg⁻¹ en dos inyecciones (Roberts y Schlieder, 1983; Tucker 1998) y el “Scamp” (*M. phenax*) inducido con 1500 UI Kg⁻¹ (Tucker 1998).

Los primeros intentos de inducción al desove con HCG en individuos silvestres de *M. rosacea* fueron llevados a cabo a finales del mes de junio donde el mayor número de huevos obtenido fue de 40 x 10³ huevos por hembra (Gracia-López *et al.*, 2004a,b). En el presente estudio, el mayor desove obtenido de una hembra silvestre fue de 302 x 10³ huevos en mayo y 220 x 10³ huevos en junio; estas diferencias en la fecundidad pueden ser atribuidas al tiempo de captura, el manejo, el diámetro inicial del ovocito en el momento de la inducción, el tamaño de la hembra y la experiencia de manejo en el momento de realizar el masaje abdominal para la obtención del desove. Es común que el manejo repetido de los reproductores mantenidos en cautiverio ocasione estrés, mortalidades o que directamente afecte la maduración final de los ovocitos (Bromage *et al.*, 1994; Bromage y Roberts, 1995; Zohar y Mylonas, 2001).

En este estudio, las inducciones al desove de hembras en cautiverio con HCG tuvieron un mejor resultado que el resto de los tratamientos experimentales. Estas diferencias podrían ser atribuidas al estrés que sufren las hembras silvestres al momento de la captura y en el caso de las inducciones con LHRHa al manejo repetido de las hembras. Todas las hembras del grupo control maduraron en

cautiverio. Los ovarios de estas hembras contenían ovocitos en vitelogénesis a partir de marzo con el mayor grado de desarrollo en abril. No se observaron desoves voluntarios dentro de los tanques y las gónadas presentaron una alta proporción de ovocitos atrésicos y pre-vitelogénicos en julio sugiriendo la sobremaduración del ovario.

Se observaron diferencias significativas en la tasa de fertilización y el número de huevos viables entre hembras inducidas con HCG silvestres y en cautiverio ($P > 0.05$), alcanzando un total de $3,027 \times 10^3$ huevos viables. Como era de esperarse, los resultados de las hembras mantenidas en cautiverio tuvieron los mejores resultados aunque la inducción de hembras silvestres puede ser una herramienta para obtener desoves fácilmente para investigación.

La mortalidad por efecto de la manipulación cuando se realizó la inducción hormonal fue nula, y aunado a la respuesta positiva ofrecida por los animales tras la inducción hormonal demuestra que la cabrilla sardinera es resistente al manejo y estrés, características que han sido demostradas para otras especies de meros (Watanabe et al. 1995; Hassin et al. 1997; Tucker 1998; Tucker 1999).

Los resultados indican que las inducciones con HCG y LHRHa son una herramienta adecuada para inducir la maduración final de los ovocitos cuando son aplicadas en hembras con DIO entre 498 y 523 μm . Esta relación directa entre la efectividad de la hormona y el tamaño del ovocito ha sido descrita para otros

meros como *E. marginatus* con DIO entre 400 y 500 μm (Spedicato *et al.*, 1995; Marino *et al.*, 2000); *E. striatus*, de 482 a 561 μm (Watanabe *et al.*, 1995) y *E. salmoides* con DIO de 400 μm , aproximadamente (Kungavankij *et al.*, 1986), entre otros. Los resultados de inducción de *M. rosacea* de este estudio, indican que las hembras con un DIO de 498 a 523 μm desovan huevos viables y que las hembras inducidas con un DIO diferente a estos pueden resultar en desoves de mala calidad.

En los individuos donde es necesario realizar un masaje abdominal para extraer los desoves de las hembras inducidas hormonalmente, es crucial determinar el momento exacto para hacerlo ya que de esto depende obtener desoves exitosos y por consiguiente la fertilización de los gametos. La tasa de fertilización aumentó cuando ajustamos el tiempo para el manejo determinado por características morfológicas y/o de comportamiento de las hembras (tamaño del abdomen, flotabilidad e hidratación de los huevos, fluidez de los huevos, comportamiento de nado, etc.) que son factores fundamentales para el masaje abdominal. Si hay un retraso en el masaje abdominal puede ocasionar sobre-maduración causando daños a los gametos y por lo tanto baja tasa de fertilización (Bromage *et al.*, 1994; Tucker, 1998; Zohar y Mylonas, 2001). Para los desoves de el mero moreno (*E. marginatus*) se obtuvo una baja tasa de fertilización después de que las hembras fueron masajeadas para desovar 74 h después de la primera inyección lo que ocasionó desoves sobre-maduros (Marino *et al.*, 2000). En este estudio, las cabrillas fueron masajeadas para desovar entre 36 y 42 horas después de la

primera inyección, que es el tiempo requerido para completar la maduración final de los ovocitos, y es similar al tiempo requerido para el mero de Nassau (*E. striatus*) (Head *et al.*, 1995).

En esta última especie, la fecundidad relativa promedio fue de 186×10^3 huevos Kg^{-1} (Watanabe *et al.*, 1995). La fecundidad relativa promedio de la cabrilla sardinera (130×10^3 huevos Kg^{-1}) fue menor que la reportada para *E. aeneus* (242×10^3 huevos Kg^{-1}) (Hassin *et al.*, 1997) y similar a la de *E. marginatus* (118×10^3 huevos Kg^{-1}) (Marino *et al.*, 2003).

El tamaño de los huevos de los peces de la familia Serranidae es extremadamente variable de 610 μm en el serrano arenoso, (*Diplectrum formosum*) hasta 1,000 μm en la cabrilla venda, (*E. amblycephalus*) (Tucker, 1998) aunque la mayor parte de las especies de meros poseen huevos entre 770 y 1,000 μm . La cabrilla sardinera tuvo un tamaño de huevo más pequeño (871 μm) que el reportado para otras especies como el "gag", (*M. microlepis*) (920 μm) (Roberts y Schlieder, 1983), la cherna criolla (*E. striatus*) (908 μm) (Watanabe *et al.* 1995) y el falso abadejo (*E. costae*) (926 μm) (Glamuzina *et al.*, 2000), similar al reportado para el mero moreno, (*E. marginatus*) (871 y 888 μm) (Spedicato *et al.*, 1995; Spedicato y Boglione, 2000) y más grande que para el mero disfrazado, (*E. microdon*) (769-832 μm) (Tamaru *et al.*, 1996). Además de estas diferencias inter-específicas entre el tamaño de los huevos, existen diferencias intra-específicas entre las diferentes

poblaciones de huevos que pueden ser producidas por deficiencias nutricionales de los reproductores o la cercanía de el periodo reproductivo (Chao *et al.*, 1993).

En años recientes, la FDA admitió el uso de la HCG como herramienta fundamental en la industria acuícola para la producción de lotes de peces y permitió su uso en reproductores bajo ciertas condiciones reguladas (CVM, 2000; Greenlees, 2000). En algunas especies tratadas con HCG se ha observado respuestas del sistema inmune lo que ha llevado a la disminución de la cantidad y calidad de los gametos (Mylonas y Zohar, 2001b). Las hembras inducidas a desovar en el presente estudio, demostraron no tener una respuesta inmune contra la HCG ya que varias fueron re-inducidas a desovar durante el mismo o el siguiente periodo reproductivo. Esto es similar a las observaciones en reproductores de *E. striatus* inducidos hasta 3 veces durante el mismo periodo reproductivo (Head *et al.*, 1996).

De todas las hembras estudiadas, solo se observaron dos desoves voluntarios dentro de los tanques, aunque no hubo cortejo por parte de los machos o fertilización de los desoves. Esto es común para otras especies de meros (*E. aeneus*) (Hassin *et al.*, 1997) y otras especies como la lubina estriada (*Morone saxatilis*) (Mylonas *et al.*, 1997) mantenidos en cautiverio dónde los reproductores no llevan a cabo la maduración final del ovocito ni desovan voluntariamente. Esta situación hace que las inducciones hormonales y el masaje abdominal sean estrictamente necesarios para obtener huevos viables. También, la falta de

desoves naturales en cautiverio o las bajas tasas de fertilización pueden ser atribuidas a otros factores que suceden después de la gametogénesis y la ovulación como son la falta de cortejo que por lo general se encuentra limitado por la profundidad del agua dentro de los tanques y el tamaño de los mismos (Okumura *et al.*, 2002). Otros factores pueden ser el fotoperiodo, temperatura, salinidad, ciclos lunares, comportamiento social (proporción sexual, territorialismo de los machos, densidad, etc.) o disruptores fisiológicos en el eje hipotálamo-pituitaria-gónada (Zohar y Mylonas, 2001; Okumura *et al.*, 2002).

El fotoperiodo y la temperatura del agua, son dos de los factores que más influyen en el ciclo reproductivo de los peces así como los desoves (Lam, 1983; Carrillo *et al.*, 1989; Zanuy *et al.*, 1995; Norberg *et al.*, 2004). El inicio del desarrollo de la recrudescencia gonadal de la cabrilla sardinera estuvo relacionado con el solsticio de invierno, donde el fotoperiodo corto (11 L:13 O), podría ser la señal de inicio de la gametogénesis.

La temperatura del agua en el momento de inicio de la gametogénesis era 18 °C. Desde marzo a junio, considerado el periodo de desoves, ya que los ovarios poseen ovocitos hidratados la temperatura del agua se sitúa en el rango de 20 a 24.7 °C, y una temperatura por arriba de 24-25 °C se relaciona con el fin del periodo de desoves coincidiendo con el alto número de ovocitos atrésicos.

3. Relación entre la concentración de esteroides sexuales y el desarrollo gonadal

Este estudio nos brinda la primera información acerca de los cambios en la concentración de esteroides sexuales durante un ciclo reproductivo y la relación que guardan respecto al desarrollo gonadal de la cabrilla sardinera *M. rosacea* mantenida en condiciones de cautiverio. Es importante resaltar que los peces utilizados en este estudio no fueron sacrificados y, por lo tanto, las concentraciones de los esteroides sexuales y la composición de los ovocitos en diferentes estados de maduración dentro del ovario, provienen de los mismos individuos monitoreados mensualmente. La intención de este estudio fue la de entender los cambios que ocurren en los peces reproductores en cautiverio con la finalidad de su aplicación en la acuicultura. Por lo que este trabajo difiere de otros donde la dinámica de los esteroides sexuales ya sea de peces cautivos o silvestres proviene de peces sacrificados a lo largo de los periodos experimentales, obteniendo un valor promedio de un grupo de peces en un momento dado. Por ejemplo en estudios del mero rojo *Epinephelus morio* (Johnson *et al.*, 1998); el mero panal, *Epinephelus merra* (Lee *et al.*, 2002; Bhandari *et al.*, 2004a, 2004b, 2005, 2006; Alam *et al.*, 2005); el mero de pintas naranjas *Epinephelus coioides* (Yeh *et al.*, 2003); el gobio, *Rhinogobiops nicholsii* (Kroon y Liley, 2000), entre otros. Adicionalmente, esta es la primera vez que se

reporta para esta especie los niveles de esteroides sexuales y su relación con el desarrollo gonadal de un pez que cambió de sexo en condiciones de cautiverio.

El análisis de las preparaciones histológicas, nos brindó la información correcta acerca del sexo de los peces al igual que nos permitió corroborar que el ovario de la cabrilla sardinera es del tipo sincrónico por grupo debido a que contiene paquetes de ovocitos en diferentes estadios de desarrollo (Kiewek-Martínez, 2004). Este tipo de ovario es común de los peces serránidos como el mero rojo *E. morio* (Johnson *et al.*, 1998) y otros peces como la lubina europea *Dicentrarchus labrax* (Asturiano *et al.*, 2002). Dentro de las especies con ovarios sincrónicos por grupo, existen diferencias en la dinámica de los esteroides sexuales. En algunas especies, se puede observar un decremento progresivo de T durante el periodo pre-ovulatorio y en otras especies se observa un decremento de E2; y en otras el E2 y la T permanecen elevados la mayor parte del periodo pre-ovulatorio (Peter y Yu, 1997).

Los factores externos, particularmente el fotoperiodo y la temperatura, son activadores del eje cerebro-pituitaria-gónada que se encuentra involucrado en la regulación de la reproducción (Rodríguez *et al.*, 2001). Los estudios con otras especies de meros como *E. morio* (Johnson *et al.*, 1998), *E. merra* (Lee *et al.*, 2002; Bhandari *et al.*, 2004a, 2005, 2006), *Epinephelus marginatus* (Marino *et al.*, 2003), y otras especies como “*Spinecheek gudgeon*” *Eleotris acanthopoma* (Wang *et al.*, 2001) también describen la relación entre un incremento de la concentración

de E2 de los estadios avanzados de desarrollo gonadal con el incremento en el fotoperiodo y la temperatura del agua. Concluyendo que para el mero *E. merra*, el E2 es responsable del mantenimiento del estado femenino y el desarrollo ovárico (Bhandari *et al.*, 2005).

En las hembras estudiadas la T que los incrementó constantemente durante el periodo reproductivo, indicando el papel que juega este como precursor de E2 el cual presentó variaciones significativas a través del periodo vitelogénico de la cabrilla sardinera *M. rosacea*. Esta regulación de producción de esteroides (E2 y 11KT) es una cadena de retroalimentación regulada por T (Schulz y Muira, 2001) e incluye la aromatización de la T para producir E2 (Yaron, 1995; Yaron y Sivan, 2006; Kroon y Liley, 2000; Schulz y Muira, 2002; Devlin y Nagahama, 2002; Barannikova *et al.*, 2004). Durante el periodo de post-desove, las gónadas se encuentran en regresión y la T ya no es convertida a E2 o 11-KT y como consecuencia hay una elevación en los niveles de T de la sangre. Resultados similares han sido obtenidos para otras especies de peces como *D. labrax* (Prat *et al.*, 1990) y el mero *E. acanthopoma* (Wang *et al.*, 2001), en los cuales la correlación entre los niveles plasmáticos de T con el desarrollo avanzado de la gónada ha sido descrito con un posterior incremento en T durante el periodo de post-desove. La 11-KT generalmente se encuentra en mayor concentración en machos que en hembras (Devlin y Nagahama, 2002) debido a que los andrógenos y la FSH son las hormonas más importantes implicadas en la regulación de la espermatogénesis (Schulz y Muira, 2002). Las hembras estudiadas tuvieron los

niveles más bajos de este andrógeno como ha sido reportado para otras especies como *E. morio* (Johnson *et al.*, 1998), *R. nicholsii* (Kroon y Liley, 2000) y *Sparidentex hasta* (Lone *et al.* 2001), entre otros. Estos estudios también concuerdan con los rangos de concentración encontrados en varias especies de ciprínidos y el atún aleta azul (Lokman *et al.*, 2002).

La producción de andrógenos en machos se mantiene elevada durante el proceso de maduración (Devlin y Nagahama, 2002; Barannikova *et al.*, 2004). Uno de los resultados más impactantes observados en los machos de este estudio fue el comportamiento bi-modal de la concentración de E2 en el plasma. El primer pico de E2 que sucedió en el periodo de pre-gametogénesis puede haberse debido a la proliferación de las células germinales en preparación para el comienzo de las divisiones meióticas que es probable que sea dependiente de E2 al igual que ha sido descrito para otros teleósteos (Miura y Miura, 2003). El segundo pico de E2 sucedió en paralelo con el de 11-KT, el esteroide más importante en la gametogénesis de los machos (Borg, 1994). Las variaciones que ocurrieron en la concentración de 11-KT durante el periodo activo de la gametogénesis (marzo a julio) describen perfectamente el rol de esta hormona en los machos debido a que hay una correlación clara entre los niveles plasmáticos de 11-KT y la tasa de espermiación de machos. Sin embargo, la elevación paralela de la concentración de E2 en el mismo periodo resulta difícil de explicar a menos que suceda una maduración progresiva no sincrónica de los machos o que el efecto de cambio de sexo siga operando en los machos. En otras especies de meros como *E. merra*, el

E2 generalmente es encontrado en concentraciones bajas ($<1 \text{ ng ml}^{-1}$) durante la espermatogénesis (Johnson *et al.*, 1998).

El análisis individualizado del perfil esteroideo de los machos en comparación con el individuo que cambió de sexo (de hembra a macho) demuestra una similitud más cercana de los patrones hormonales (E2, T y 11-KT) que con los patrones de las hembras, lo que sugiere que el patrón bimodal de E2 sin cambios significativos en los niveles de T y una elevación significativa de los niveles de 11-KT durante el periodo de desove parecen ser el patrón del cambio de sexo de la cabrilla sardinera en condiciones de cautiverio. Sin embargo, el individuo que cambió de sexo, el patrón hormonal de 11-KT incrementó en junio, seguido por un decremento en los niveles de E2 en julio para alcanzar el nivel más bajo desde agosto hasta el final del experimento. En estudios con *E. morio*, se observó también una caída en los niveles de E2 que fue atribuida a la degeneración del tejido ovárico (Johnson *et al.*, 1998). Los resultados para *E. merra* (Bhandari *et al.*, 2004a, Bhandari *et al.*, 2004b, Bhandari *et al.*, 2005), *R. nicholsii* (Kroon y Liley, 2000) y *Halichoeres trimaculatus* (Higa *et al.*, 2003) sugieren que la diferenciación sexual hacia la fase de macho se consigue cuando hay un decremento en los estrógenos y un incremento en los niveles de andrógenos.

Las observaciones de varias especies de peces, demuestran un incremento drástico en los niveles plasmáticos de 11-KT (revisado por Devlin y Nagahama, 2002), como en meros silvestres (*E. merra*) y peces inducidos a cambiar de sexo.

Esto sugiere que este esteroide juega un papel fundamental en la diferenciación sexual (Bhandari *et al.*, 2004a; Bhandari *et al.*, 2004b). Aunque en otras especies como la tilapia, la diferenciación sexual hacia macho es disparada por la ausencia de E2 en lugar de el incremento de andrógenos (Yaron y Sivan, 2005).

Durante el periodo reproductivo, la concentración de algunas hormonas de machos teleósteos en sangre, muestran cambios drásticos los cuales son iniciados por las GTHs las cuales inducen el incremento en la producción de los esteroides testiculares (Schulz y Muira, 2002). La producción de andrógenos en los machos se mantiene en niveles elevados durante la maduración (Devlin y Nagahama, 2002; Barannikova *et al.*, 2004). En este estudio, los niveles de andrógenos de *M. rosacea* comienzan a incrementar en abril, lo que coincide con la presencia de esperma fluido indicando que los niveles de T incrementan cerca o al inicio de la producción espermática y que la 11-KT es elevada en la espermiación. En el mero *E. morio* (Johnson *et al.*, 1998), *E. merra* (Bhandari *et al.*, 2004a, 2005), y *D. labrax* (Prat *et al.*, 1990; Rodríguez *et al.*, 2001) también se han descrito niveles elevados de T y 11-KT al inicio de la espermatogénesis. El E2 generalmente se encuentra presente en bajas concentraciones ($<1 \text{ ng ml}^{-1}$) durante la espermatogénesis, como en *E. merra* (Johnson *et al.*, 1998), coincidiendo con los resultados obtenidos en este estudio para la cabrilla sardinera.

En los peces, existe una regulación mediada por la producción de andrógenos que es una retroalimentación ejercida por la T (Schulz y Muira, 2001). Este sistema de retroalimentación incluye la aromatización de T para producir E2 (Yaron, 1995; Yaron y Sivan, 2006). En este estudio, las hembras tuvieron una mayor concentración de T que los machos, que puede ser explicado debido a que la T es el precursor de E2 y 11-KT, por lo que es necesario en una mayor concentración (Kroon y Liley, 2000; Schulz y Muira, 2002; Devlin y Nagahama, 2002; Barannikova *et al.*, 2004). Estudios con otras especies de peces han descrito resultados similares como para *D. labrax* (Prat *et al.*, 1990) y *E. acanthopoma* (Wang *et al.*, 2001).

La 11-KT por lo general se encuentra en mayor concentración en machos que en hembras (Devlin y Nagahama, 2002) debido a que los andrógenos y la FSH son las dos hormonas principales involucradas en la regulación de la espermatogénesis (Schulz y Muira, 2002). En este estudio, las hembras tuvieron una menor concentración de este andrógeno como ha sido reportado para otras especies como *E. morio* (Johnson *et al.*, 1998), donde se describe una relación directa entre los niveles de 11-KT y el IG, *R. nicholsii* (Kroon y Liley, 2000), y *Sparidentex hasta* (Lone *et al.*, 2001), entre otros. Estos estudios también coinciden con los rangos de concentración cuantificados en varias especies de ciprínidos y el atún de aleta azul (Lokman *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que el cambio de sexo en los peces hermafroditas protogíneos puede ocurrir durante y fuera del periodo reproductivo (Johnson *et al.*, 1998; Sarter *et al.*, 2006). En el presente estudio, la transformación hacia macho ocurrió después el periodo reproductivo en agosto, aunque ya había sido demostrado este hecho en marzo, durante el periodo reproductivo (Kiewek-Martínez *et al.*, datos no publicados). Esto coincide con el estudio realizado por Whiteman *et al.* (2005) en el cual describen que el cambio de sexo para el mero *Epinephelus guttatus* puede ocurrir durante el periodo reproductivo.

Para los peces hermafroditas protogíneos, los andrógenos y estrógenos se encuentran relacionados con el cambio de sexo (Kroon y Liley, 2000). La 11-KT es considerada como uno de los factores más importantes en la iniciación de la proliferación espermatogonial hacia la meiosis (Schulz y Muira, 2002). Existen observaciones en algunas especies de peces donde se muestra un incremento drástico en la concentración plasmática de 11-KT (revisado por Devlin y Nagahama, 2002), como en *E. merra* y algunos peces inducidos a cambiar el sexo. Esto sugiere que este esteroide juega un papel fundamental en el cambio de sexo (Bhandari *et al.*, 2004a, 2004b). Aunque en otras especies, tales como la tilapia, la diferenciación sexual hacia macho, se dispara por la ausencia de E2 en lugar de por la presencia de andrógenos (Yaron y Sivan, 2005).

La hembra que cambió de sexo, tenía concentraciones plasmáticas elevadas de 11-KT en junio coincidiendo con el fin de la época de desove, seguido por el

decremento de E2 en julio para llegar al nivel más bajo de E2 a partir de agosto. En estudios con *E. morio*, también se puede observar una disminución en la concentración de E2 la cual es atribuida a la degeneración del tejido ovárico (Johnson *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos para *E. merra* (Bhandari *et al.*, 2004a, 2004a, 2005), *R. nicholsii* (Kroon y Liley, 2000), y *Halichoeres trimaculatus* (Higa *et al.*, 2003) sugieren que el cambio de sexo en peces hermafroditas protogíneos sucede cuando hay un decremento en los niveles de estrógenos (E2) y un incremento en andrógenos.

Esta evidencia sustenta el uso de 11-KT o 17 α -methyltestosterona para inducir la espermiación o el cambio de sexo de hembra a macho (Devlin y Nagahama, 2002). Sarter *et al.* (2006) obtuvo para *E. marginatus* el cambio de sexo al tratar con implantes de liberación controlada de MT y concluyen que esta hormona actúa directamente como inductor del cambio de sexo y que los niveles de 11-KT (<0.3 ng ml⁻¹) y T (<3 ng ml⁻¹) se mantienen bajos. El cambio de sexo también puede ser inducido mediante el tratamiento con inhibidor de la aromatasa (AI, ej: fadrozole) que es un compuesto no esterooidal que bloquea la actividad de la enzima aromatasa que es la responsable de la conversión de andrógenos hacia estrógenos y provoca un decremento en la concentración de E2 y el completo cambio de sexo de *E. merra* (Bhandari *et al.*, 2004a, 2004b). El cambio de sexo también puede ser inducido por factores sociales en algunos peces hermafroditas protogíneos, en los cuales la unidad social comprendida por varios individuos pequeños y un macho grande y dominante. Cuando este macho dominante

desaparece o no puede continuar manteniendo el control de las hembras, una de las hembras más grandes podría cambiar de sexo (Quintio *et al.*, 1997; Yaron y Sivan, 2006).

Johnson *et al.* (1998) sugieren que la T no juega un papel importante en el proceso de cambio de sexo. Esto difiere de los resultados obtenidos para *E. coioides* (Yeh *et al.*, 2003), donde no se observó algún cambio de sexo después de implantar 11-KT, lo que sugiere que la T tiene una correlación directa con el desarrollo testicular durante el cambio controlado de sexo mientras que la 11-KT no.

Lone *et al.* (2001) observan para el pez hermafrodita protrádrico *S. hasta*, que los machos generalmente tienen una baja concentración de E2 y que los niveles de E2 incrementan en los machos que se encuentran en reversión sexual y junto a la disminución de los niveles de T y 11-KT, el cual está relacionado con el E2 y la aparición de ovocitos.

Existen varios estudios con meros que han descrito la dificultad de obtener machos maduros en cautiverio para poder realizar la fertilización artificial, como lo reportado por Yeh *et al.* (2003) para *E. coioides*, donde observaron machos maduros después de siete años de haber sido mantenidos en condiciones de cautiverio. Para la cabrilla sardinera, hemos podido observar la presencia de machos maduros y cambios de sexo naturales en cautiverio después de sólo un

año. Esto confirma la rápida adaptación de esta especie a las condiciones de laboratorio y de manipulación.

CONCLUSIÓN

Se demostró la relación directa entre los niveles de esteroides sexuales y el grado de desarrollo gonadal. Las hembras de la cabrilla sardinera mantenidas en cautiverio, podrían ser inducidas a desovar mediante el control del fotoperiodo y la temperatura del agua o mediante el suministro de hormonas exógenas a partir del mes de marzo hasta julio donde podemos encontrar la mayor actividad reproductiva.

Se observó un cambio de sexo natural el cual puede ser considerado como un cuello de botella en el cultivo de esta especie mantenida en condiciones de cautiverio. Se sugiere permitir el establecimiento de las proporciones sexuales dentro de los tanques antes de llevar a cabo algún tipo de ensayo con un determinado número de machos o hembras. Es importante destacar que no es necesario el sacrificio de los reproductores para llevar a cabo este tipo de estudios, evitando así el impacto negativo en las poblaciones naturales de la especie. Todos los individuos fueron repetidamente muestreados y mantenidos en condiciones artificiales en cautiverio como lo sugerido por Bhandari *et al.* (2003). Por lo tanto, los cambios secuenciales dentro de la gónada provienen del mismo individuo presentado como un caso representativo. El cambio de sexo pudo haber sido ocasionado por la ausencia de machos en los tanques por lo que fue inducido por interacciones sociales. Los eventos nos llevan a concluir que las hembras en cautiverio pueden cambiar de sexo dentro de una alta gama de tamaños y

refuerza la posición que el cambio de sexo es un factor importante de ser considerado en la composición de lotes de reproductores para la actividad acuícola.

LITERATURA CITADA

- Abu-Hakima. 1987. Aspects of the reproductive biology of the grouper, *Epinephelus tauvina* (Forskål), in Kuwaiti waters. *J. Fish Biol.*, 30: 213-222.
- Aida K. 1988. A review of plasma hormone changes during ovulation in cyprinid fishes. *Aquaculture*, 74: 11–21.
- Alam M.S., Komuro H., Bhandari R.K., Nakamura S., Soyano K. y Nakamura M. 2005. Immunohistochemical evidence identifying the site of androgen production in the ovary of the protogynous grouper *Epinephelus merra*. *Cell. Tissue Res.*, 320: 323-329.
- Alam M.S., Bhandari R.K., Kobayashi Y., Soyano K. and Nakamura M. 2006. Induction of sex change within two full moons during breeding season and spawning in grouper. *Aquaculture*, 255: 532-535.
- Allen G.R. y Robertson D.R. 1998. Peces del Pacífico Oriental Tropical. CONABIO, Agrupación Sierra Madre y CEMEX, México 327 pp.
- Asturiano J.F., Sorbera L.A., Ramos J., Kime D.E., Carrillo M. y Zanuy S. 2002. Group-synchronous ovarian development, ovulation and spermiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) could be regulated by shifts in gonadal steroidogenesis. *Sci. Mar.*, 66: 273–282.
- Barannikova I.A., Bayunova L.V. y Semenkova T.B. 2004. Serum levels of testosterone, 11-ketosterone and oestradiol-17 β in three species of sturgeon during gonadal development and final maturation induced by hormonal treatment. *J. Fish Biol.*, 64: 1330–1338. doi: 10.1111/j.1095-8649.2004.00395.x.
- Baroiller J.F., Guiguen Y. and Fostier A. 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cell. Mol. Life Sci.*, 55: 910-931.
- Barry T.P., Santos A.J.G., Furukawa K., Aida K. y Hanyu I. 1990. Steroid profiles during spawning in male common carp. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 80: 223-231.
- Bhandari R.K., Komuro H., Nakamura S., Higa M. y Nakamura M. 2003. Gonadal restructuring and correlative steroid hormone profiles during natural sex change in protogynous Honeycomb Grouper (*Epinephelus merra*). *Zool. Sci.*, 20: 1399-1404.

- Bhandari R.K., Komuro H., Higa M. y Nakamura M. 2004a. Sex inversion of sexually immature honeycomb grouper (*Epinephelus merra*). Zool. Sci., 21: 305–310.
- Bhandari R.K., Higa M., Nakamura S. y Nakamura M. 2004b. Aromatase inhibitor induces complete sex change in the protogynous honeycomb grouper (*Epinephelus merra*). Mol. Reprod. Dev., 67: 303–307.
- Bhandari R.K., Alam M.A., Higa M., Soyano K. y Nakamura M. 2005. Evidence that estrogen regulates the sex change of Honeycomb Grouper (*Epinephelus merra*), a protogynous hermaphrodite fish. J. Exp. Zoo., 303A: 497–503.
- Bhandari R.K., Alam M.A., Soyano K., Nakamura M. 2006. Induction of female-to-male sex change in the honeycomb grouper (*Epinephelus merra*) by 11-ketotestosterone treatments. Zool Sci 23: 65-69.
- Billard, R., P. Reinaud, M. G. Hollebecq and B. Breton. 1984. Advancement and synchronization of spawning in *Salmo gairdneri* and *S. trutta* following administration of LHRH-A combined or not with pimiozide. Aquaculture 43:57-66.
- Billard R. 1989. Endocrinology and fish culture. Fish Physiol. Biochem., 7(1-4): 49-58.
- Borg B. 1994. Androgens in teleost fishes. Comp. Biochem. Physiol. C 109: 219-245.
- Bromage N.R., Bruce M., Basavaraja N., Rana K., Shields R., Yong C., Dye J., Smith P., Gillespie M., Gamble J. 1994. Egg quality determinants in finfish: the role of overripening with special reference to the timing of stripping in the Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. J. World Aquac. Soc. 25: 13–21.
- Bromage N.R. and Roberts R.J. (1995) Broodstock management and egg and larval quality. Blackwell science. 432 p.
- Bruslé J. y Bruslé S. 1975. Ovarian and testicular intersexuality in two protogynous Mediterranean groupers, *Epinephelus aenus* and *Epinephelus guaza*. En: Reinboth R. (Ed). Intersexuality in the animal kingdom. Springer-Verlag, New York pp-222-227.
- Brusle S. 1987. Sex-inversion of the hermaphroditic protogynous teleost *Coris julis* L. (Labridae). J. Fish Biol., 30(5): 605-616.
- Caddell S.M., Gadomski D.M. y Abbott L.R. 1990. Induced spawning of the California Halibut, *Paralichthys californicus*, (Pisces: Paralichthyidae) under artificial and natural conditions. Fish. Bull., 174: 175-197.

- Candi G., Castriota L., Andaloro F., Finioia M.G., Marino G. 2004. Reproductive cycle and sex inversion in razor fish, a protogynous labrid in the southern Mediterranean Sea. *J. Fish Biol.*, 64: 1498-1513.
- Carrillo M., Bromage N., Zanuy S., Serrano R. y Prat F. 1989. The effect of modifications in photoperiod on spawning time, ovarian development and egg quality in the Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) *Aquaculture*, 81: 351-365.
- Chan S.T.H. y Yeung W.S.B. 1989. Sex steroids in intersexual fishes. *Fish Physiol. Biochem.*, 7(1-4): 229-235.
- Chao, T.M., Lim L.C. and Khoo L.T. 1993. Studies on the breeding of brown-marbled grouper (*Epinephelus fusoguttatus* Forsskal) in Singapore. Pages 143-156 in C. S. Lee, M. S. Su and I. C. Liao editors. *Finfish hatchery in Asia. Proceedings of finfish hatchery in Asia'91*. Tungkang, Kaoshiung, Taiwan, 17-19 December 1991. Tungkang Marine Laboratory, Tungkang, Kaoshiung, Taiwan.
- Charnov E.L., Los-den Hartogh R.L., Jones W.T. y Van den Assem J. 1981. Sex ratio evolution in variable environment. *Nature*, 289: 27-32.
- Coleman F., Koenig C. y Collins L.A. 1996. Reproductive styles of shallow-water groupers (Pisces: Serranidae) in the eastern Gulf of Mexico, consequences of fishing spawning aggregations. *Environ. Biol. Fish.*, 47: 129-141.
- Cuisset B., Pradelles P., Kime D.E., Kühn E.R., Babin P., Davail S. y Le Menn F. 1994. Enzyme immunoassay for 11-ketotestosterone using acetylcholinesterase as label: application to the measurement of 11-ketotestosterone in plasma of Siberian sturgeon. *Comp. Biochem. Physiol.*, 180C: 229-241.
- CVM. 2000. Guidance for Industry #71. Use of Human Chorionic Gonadotropin (HCG) as a Spawning Aid for Fish. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine. April, 1998 (rescinded February 23, 2000). <http://www.fda.gov/cvm/fda/TOCs/guideline72.htm>
- Devlin R.H. y Nagahama Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Review article. *Aquaculture*, 208: 191-364. 467.
- Diaz-Urbe J.G., Elorduy-Garay J.F., y Gonzalez-Valdovinos M.T. 2001. Age and growth of the leopard grouper, *Mycteroperca rosacea*, in the southern gulf of California, Mexico. *Pac. Sci.*, 55(2): 171-182.

- FAO. 2002. Fishery Information Data and Statistics Unit (FIDI). Fishery Statistical Collections. FIGIS Data Collection. FAO - Rome. Updated Tue Mar 07 12:03:57 CET 2006.
- Forniés M.A., Mañanós 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. y Zohar Y. 1983. The gonadal steroids. En: Hoar, W.S., D.J. Randall y E.M. Donaldson (ed). *Fish Physiology*. 9A. Academic Press, EUA. 277-346.
- Glamuzina B., Glavic N., Skaramuca B., Kozul V. 1998. Induced sex reversal of dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe). *Aquac. Res.*, 29: 563-567.
- Glamuzina B., N. Glavic, P. Tutman, V. Kozul and B. Skaramuca. 2000. Egg and early larval development of laboratory reared goldblotch grouper *Epinephelus costae* (Steindachner 1878) (Pisces: Serranidae). *Scientia Marina* 64(3):341-345.
- Gómez-Rojo M.E. 2007. Susceptibilidad de las fases iniciales de vida de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* a la infección experimental por *Aeromonas hydrophila*. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Goudie C., Simco B.A., Davis K.B. y Parker N.C. 1992. Reproductive performance of pigmented and albino female channel catfish induced to spawn with HCG or ovaprim. *J. World Aquac. Soc.* 23(2): 138-145.
- Gracia-López V., Kiewek-Martínez M. y Maldonado-García M. 2004b. Effects of temperature and salinity on artificially reproduced eggs and larvae of leopard grouper *Mycteroperca rosacea*. *Aquaculture*, 237: 485-498.
- Gracia-López V., Kiewek-Martínez M., Maldonado-García M., Monsalvo-Spencer P., Portillo-Clark G., Civera-Cerecedo R., Linares-Aranda M., Robles-Mungaray M. y Mazón-Suástegui J.M. 2005. Larvae and juvenile production of the leopard grouper, *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877). *Aquac. Res.*, 36(1): 110-112.
- Gracia-López V., Rodríguez-Romero J. y Pérez-Ramírez J.M. 2004a. Induced spawning and embryonic development of the leopard grouper *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877). *Cienc. Mar.*, 30(2): 279-284.

- Greenles K. 2000. CHORULON®: A case study of flexibility in the new animal Drug approval process. *FDA Veterinarian* 15(6).
- Harmin S.A., Crim S.W. y Wiegand M.D. 1995. Plasma sex steroid profiles and the seasonal reproductive cycle in male and female winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Mar. Biol.*, 121: 601-610.
- Hassin S., Monbrison D., Hanin Y., Elizur A., Zohar Y. y Popper D.M. 1997. Domestication of the white grouper, *E. aeneus*: 1. Growth and reproduction. *Aquaculture*, 156(3-4): 305-316.
- Head W.D., Kerlley C.D., Moriwake A., Lee C.S. y Bienfang P.K. 1995. Progress in controlled breeding of Nassau Grouper (*Ephinephelus striatus*) broodstock by hormone induction. *Aquaculture*, 138: 205-219.
- Head W.D., Watanabe W.O., Ellis S.C. y Ellis E.P. 1996. Hormone-induced multiple spawning of captive Nassau grouper broodstock. *Prog. Fish Cult.*, 58: 65-69.
- Heemstra P.C. y Randall J.E. 1993. FAO species catalogue. Vol. 16. Groupers of the world. (Family Serranidae, Subfamily Epinephelinae). FAO Fish. Synops. No. 125, Vol. 16.
- Higa M., Ogasawara K., Sakaguchi A., Nagahama Y. y Nakamura M. 2003. Role of steroid hormones in sex change of protogynous wrasse. *Fish Physiol. Biochem.*, 28: 149–150.
- Hobson E.S. 1968. Predatory behavior of some shore fishes in Gulf of California. U.S. Fish Wildlife Service, Bureau Sport Fisheries. Wildlife Research Report, 73, 92 p.
- IUCN 2006. 2006 IUCN Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 05 June 2007.
- Jalabert B. 2005. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reprod. Nutr. Develop.*, 45: 261-279.
- Johnson A.K., Thomas P. y Wilson R.R. 1998. Seasonal cycles of gonadal development and plasma sex steroid levels in *Epinephelus morio*, a protogynous grouper in the eastern Gulf of Mexico. *J. Fish Biol.*, 52: 500-518.
- Kagawa H., Young G., Adachi S. y Nagahama Y. 1982. Estradiol-17 β production in amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) ovarian follicles: Role of the thecal and granulosa cells. *Gen. Comp Endocrinol.*, 47: 440–448.

- Kah O., Pontet A., Núñez J., Calas A. y Breton B. 1989. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for goldfish gonadotropin. *Biol. Reprod.*, 41: 67-73.
- Karnovsky M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 27: 137-138.
- Kiewek-Martínez N.M. 2004. Contribución al conocimiento de la reproducción en cautiverio de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*. Tesis de maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), La Paz, Mexico.
- King W.V., Thomas P., Harrell R.M., Hodson R.G. y Sullivan C.V. 1994. Plasma levels of gonadal steroids during final oocyte maturation of striped bass, *Morone saxatilis* L. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 95: 178-191.
- Kobayashi M., Aida K. y Flanyu I. 1986. Hormone changes during the ovulatory cycle in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 69: 301-307.
- Kohno H., Imanto P.T., Diani S., Slamet B. y Sunyoto P. 1990. Reproductive performance and early life history of the grouper *Epinephelus fuscoguttatus*. *Bull. Penang Perikanan Special Ed.*, 1: 27-35.
- Kroon F.J. y Liley N.R. 2000. The Role of steroid hormones in protogynous sex change in the blackeye goby, *Coryphopterus nicholsii* (Teleostei: Gobiidae). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 118: 273-283.
- Kungvankij P, Tiro L.B., Pudadera B.P. y Potestas I.O. 1986. Induced spawning and larval rearing of grouper (*Epinephelus salmoides* Maxwell). Pages 663-666 in J. L. Maclean, L. B. Dizon and L. V. Hosillos editors. *Proceedings of the First Asian Fisheries Forum*. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.
- Kuo M., Ting Y.Y. y Yeh S.L. 1988. Induced sex reversal and spawning of blue spotted grouper, *Epinephelus fario*. *Aquaculture* 71: 113-126.
- Lam T.J. 1983. Environmental influences on gonadal activity in fish. Pages 65-116. in W. S. Hoar, D. J. Randall and E. M. Donaldson editors. *Fish Physiology* 9(B) Academic Press, New York.
- Lee Y.D., Park S.H., Takemura A. y Takano K. 2002. Histological observations of seasonal reproductive and lunar-related spawning cycles in the female honeycomb grouper *Epinephelus merra* in Okinawan waters. *Fish. Sci.*, 68(4): 872-877.

- Lee W.K. y Yang S.W. 2002. Relationship between ovarian development and serum levels of gonadal steroid hormones and induction of oocyte maturation and ovulation in the cultured female Korean spotted sea bass *Lateolabrax maculatus* (Jeom-nong-eo). *Aquaculture* 207: 169-183.
- Lim L.C. 1993. Larviculture of the greasy grouper *Epinephelus tauvina* F. and the brown-marbled grouper *E. fuscoguttatus* F. in Singapore. *J. World Aquac. Soc* 24(2): 262-273.
- Linares-Aranda M. 2003. Efecto de temperatura y salinidad en el desarrollo embrionario y en larvas de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877). Tesis de Licenciatura. UABCS-CIBNOR.
- Lokman P.M., Harris B., Kusakabe M., Kime D.E., Schulz R.W., Adachi S. y Young G. 2002. 11-Oxygenated androgens in female teleosts: prevalence, abundance, and life history implications. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 129: 1–12.
- Lone K.P., Al-Ablani S. y Al-Yaqout A. 2001. Steroid hormone profiles and correlative gonadal histological changes during natural sex reversal of sobaity kept in tanks and sea-cages. *J. Fish Biol.*, 58: 305–324.
- Mañanós E., Nuñez J., Zanuy S., Carrillo M. y Le Menn F. 1994. Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) Vitellogenin II. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Comp. Biochem. Physiol.*, 107B: 217-223.
- Marino G., Azzurro E., Finoia M.G., Messina M.T., Massari A. y Mandich A. 2000. Recent advances in induced breeding of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Cah. Opt. Méditer.*, 47: 215-225.
- Marino G., Azzurro E., Massari A., Finoia M.G. y Mandich A. 2001. Reproduction in the dusky grouper from the southern Mediterranean. *J. Fish Biol.*, 58: 909–927.
- Marino G., Panini E., Longobardi A., Mandich A., Finoia M.G., Zohar Y. y Mylonas C.C. 2003. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), with a sustained-release GnRH α implant. *Aquaculture*, 219: 841–858.
- Martínez-Lagos R., Gracia-López V. 2009. Morphological development and growth patterns of the leopard grouper *Mycteroperca rosacea* during larval development. *Aquac. Res.* doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02313.x.
- Martínez-Lagos R., Tovar-Ramírez D., Gracia-López V., Lazo J.P. 2009. Evaluación de la capacidad digestiva de la cabrilla sardinera (*Mycteroperca rosacea*) durante su desarrollo larvario. *Cienc. Mar. In Press.*

- McGovern J.C., Wyanski D.M., Pashuk O., Manooch C.S., II, y Sedberry G.R. 1998. Changes in the sex ratio and size at maturity of gag, *Mycteroperca microlepis*, from the Atlantic coast of the southeastern United States during 1976-1995. Fish. Bull., 96: 797-807.
- Mendoza-Bustamante J.A. 2002. Aspectos ecológicos del reclutamiento de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877) (Pisces: Serranidae) en camas de sargazo, San Juan de la Costa, B.C.S., México. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California Sur. Noviembre del 2002.
- Merson R.R., Casey C.S., Martínez C., Soffientino B., Chandlee M. y Specker J.L. 2000. Oocyte development in summer flounder: seasonal changes and steroid correlates. J. Fish Biol., 57: 182-196.
- Miura T. y Miura C.I. 2003. Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. Fish Physiol. Biochem. 28: 181-186.
- Mylonas C.C., Gissis A., Magnus Y. and Zohar Y. 1997a. Hormonal changes in male white bass (*Morone saxatilis*) and evaluation of milt quality after treatment with a sustained-release GnRHa-delivery system. Aquaculture, 153(3-4): 301-313.
- Mylonas C.C., Scott A.P. y Zohar Y. 1997b. Plasma gonadotropin II, sex steroids and thyroid hormones in wild striped bass (*Morone saxatilis*) during spermiation and final oocyte maturation. Gen. Comp. Endocrinol., 108: 223-236.
- Mylonas, C.C., Woods L.C. III and Zohar Y. 1997c. Cyto-histological examination of post-vitellogenesis and final oocyte maturation in captive-reared striped bass. J. Fish Biol., 50: 34-49.
- Mylonas C.C., Woods L.C., 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 GnRHa-delivery systems. Gen. Comp. Endocrinol., 110: 276-289.
- Mylonas, C. C. and Zohar Y. 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. Rev. Fish Biol. Fisheries., 10: 463-491.
- Mylonas, C.C., Sigelaki I., Divanach P., Mañanós E., Carrillo M. and Afonso-Polyviou A. 2003. Multiple spawning and egg quality of individual European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) females after repeated injections of GnRHa. Aquaculture 221: 605-620.

- Nagahama Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int. J. Dev. Biol.* 38: 217-229.
- Nakamura M., Hourigan T.F., Yamauchi K., Nagahama Y. y Grau E.G. 1989. Histological and ultrastructural evidence for the role of gonadal steroid hormones in sex change in the protogynous wrasse (*Thalassoma duperrey*). *Env. Biol. Fish.* 24: 117-136.
- Ng T.B. y Idler D.R. 1983. Yolk formation and differentiation in teleost fishes. En: Hoar W.S., Randall D.J. y Donaldson E.M. (ed). *Fish Physiology*. 9A. Academic Press. EUA. 373-397.
- Norberg B., Brown C.L., Halldorsson O., Stensland K. y Björnsson B.T. 2004. Photoperiod regulates the timing of sexual maturation, spawning, sex steroid and thyroid hormone profiles in the Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, 229(1-4): 451-467.
- Okumura S., Okamoto K., Oomori R. y Nakazono A. 2002. Spawning behaviour and artificial fertilization in captive reared red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. *Aquaculture*, 206: 165–173.
- Patiño R., Sullivan C.V. 2002. Ovarian follicle growth, maturation and ovulation in teleosts fish. *Fish Physiol. Biochem.*, 26: 57-70.
- Peláez-Mendoza A.K. 1997. Hábitos alimenticios de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* Streets, 1877 (Pises: Serranidae) en la Bahía de La Paz B.C.S y zonas adyacentes. Tesis Licenciatura. UABCS.
- Peter R.E. 1983. The brain and neurohormones in teleost reproduction. En: Hoar W.S., Randall D.J. y Donaldson E.M. (ed). *Fish Physiology*. 9A. Academic Press. EUA. 97-135.
- Peter R.E. y Yu K.L. 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: Basic and applied aspects. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 7: 173–797.
- Prat F., Zanuy S., Carrillo M., De Mones A. y Fostier A. 1990. Seasonal changes in plasma levels of gonadal steroids of sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 78: 361-373.
- Pudadera B., Hamid H.L.H.A.B.D. y Yusof H.R.H.M. 2002. Grouper culture development in Brunei Darussalam. In APEC/NACA eds. Report of the APEC/NACA. Cooperative Grouper Aquaculture Workshop, Hat Yai, Thailand, 7–9 April 1999, pp. 53–56. Bangkok, Thailand, NACA. (available at www.enaca.org/Grouper/Publications/HatYaiProceeding.pdf).

- Quinitio G.F., Caberoy N.B. y Reyes D.M.Jr. 1997. Induction of sex change in female *Epinephelus coioides* by social control. *Isr. J. Aquac. – Bamidgeh.*, 49: 77–83.
- Reyes-Becerra M., Tovar-Ramirez D., Ascencio-Valle F., Civera-Cerecedo R., Gracia-López V., Barbosa-Solomieu V. 2008. Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. *Aquaculture*, 280(1-4): 39-44.
- Reyes Becerril M. 2008. Efecto de microdietas enriquecidas con levaduras secretoras de poliaminas, sobre la supervivencia y respuesta del sistema inmunológico en juveniles de la cabrilla sardinera (*Mycteroperca rosacea*) Tesis de doctorado. CIBNOR
- Ritar A. y Pribadi T.A. 2006. Hormonally induced spawning, embryonic development, and larval rearing of the southern temperate banded morwong *Cheilodactylus spectabilis*. *J. World Aquac. Soc.*, 37(4): 397-406.
- Roberts D.E. Jr. y R.A. Schlieder. 1983. Induced sex inversion maturation spawning and embryogeny of the protogynous grouper *Mycteroperca microlepis*. *J. World Mar. Soc.*, 14: 639-649.
- Robertson D.R. 1972. Social control of sex reversal in a coral-reef fish. *Science*, 173: 1007-1009.
- Robertson D.R. y Justines G. 1982. Protogynous hermaphroditism and gonochorism in four Caribbean reef gobies. *Environ. Biol. Fish.*, 7(2): 137-142.
- Robertson D.R., Reinboth R. y Bruce R.W. 1982. Gonochorism, protogynous sex-change and spawning in three sparismatiline parrotfishes from the western Indian Ocean. *Bull. Mar. Sci.*, 32: 868-879.
- 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.
- Rohr D.H.P., Lokman M., Davie P.S. y Young G. 2001. 11-Ketotestosterone induces silvering-related changes in immature female short-finned eels, *Anguilla australis*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Physiol.*, 130: 701–714.
- Rosenblatt R.H. y Zahuranec B.J. 1967. The Eastern Pacific grouper of the genus *Mycteroperca*, including a new species. *Calif. Fish Game*, 53(4): 228-245.

- Ross R.M., Losey G.S., Diamond M. 1983. Sex change in a coral-reef fish: dependence of stimulation and inhibition on relative size. *Science*, 221: 574-575.
- Sadovy Y., Colin P.L. y Domier M.L. 1994a. Aggregation and spawning in the tiger grouper *Mycteroperca tigris* (Pisces: Serranidae). *Copeia*, 2: 511-516.
- Sadovy Y., Rosario A. y Román A. 1994a. Reproduction in an aggregating grouper, the red hind *Epinephelus guttatus*. *Environ. Biol. Fish.*, 41: 269–286.
- Sadovy Y. 2000. Regional survey for fry/fingerling supply and current practices for grouper mariculture: evaluating current status and long-term prospects for grouper mariculture in South East Asia. Final report to the Collaboration APEC grouper research and development network (FWG 01/99). December, 2000.
- Sarter K., Papadaki M., Zanuy S. y Mylonas C.C. 2006. Permanent sex inversion in 1-year-old juveniles of the protogynous dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) using controlled-release 17 α -methyltestosterone implants. *Aquaculture*, 256: 443–456.
- Schulz R.W. y Miura T. 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiol. Biochem.*, 26: 43–56.
- Shapiro D.Y. 1980. Serial female sex changes after simultaneous removal of males from social groups of coral reef fish. *Science*, 209: 1136-1137.
- Shapiro D.Y. 1987a. Differentiation and evolution of sex change in fishes. *Bioscience*, 37: 490-497.
- Shapiro D.Y. 1987b. Reproduction in groupers. En: Polovina J.J. y Ralston S (Eds). *Tropical snappers and groupers: Biology and fisheries Management*. Westview Press, Boulder, CO. pp. 295-327.
- Smith C.L. 1965. The pattern of sexuality and the classification of serranid fishes. *Am. Mus. Novit.*, 2207: 1-20.
- Spedicato M.T., Lembo G., Di Marco P y Marino G. 1995. Preliminary results in the breeding of dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *Cah. Opt. Méditerr.*, 16: 131-148.
- Spedicato, M.T. y C. Boglione. 2000. Main constraints in the artificial propagation of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe 1834): Three years

- experimental trials on induced spawning and larval rearing. Cah. Opt. Méditerran., 47: 227-234.
- Strüssmann C.A. y Nakamura M. 2002. Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. Fish Physiol. Biochem., 26: 13–29.
- Tamaru C.S., Carlstromtrick C., Fitzgerald W.J. y Ako H. 1996. Induced final maturation and spawning of the marbled grouper *Epinephelus microdon* captured from spawning aggregations in the republic of Palau Micronesia. J. World Aquac. Soc., 27(4): 363-372.
- Tanaka H., Hirose K., Nogami K.Y., Hattori K. y Ishibashi N. 1990. Sexual maturation and sex reversal in red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture, 17: 1-15.
- Thomas P. y Boyd N. 1988. Induced spawning of spotted sea trout red drum and Orangemouth corvina (Family: Sciaenidae) with luteinizing hormone-releasing hormone analogue injection. Contrib. Mar. Sci., 30: 43-48.
- Tseng W.Y. y Poon C.T. 1983. Hibridizadion of *Epinephelus* species. Short communication. Aquaculture 34: 177-182.
- Tseng W.Y. y Ho S.K. 1988. The biology and culture of red grouper. Chien Cheng publisher. Kaohsiug R.O.C. 134 p.
- Tucker, J. W. Jr. 1998. Marine fish culture. Kluwer academic publishers. USA. 750 p.
- Tucker J.W.Jr. 1999. Species profile. Grouper aquaculture. Southern Regional Aquaculture Center. SRAC Publication 721.
- Tucker J.W.Jr. y Fitzgerald W.J. 1994. Induced spawning of two western tropical Pacific groupers *Plectropomus areolatus* and *Epinephelus fuscoguttatus* in Palau. Asian Fish. Sci., 7: 57-62.
- Tupper M. y Sheriff N. 2008. Capture-based aquaculture of groupers. In: A. Lovatelli y P.F. Holthus (eds). Capture-based aquaculture. Global overview. FAO Fisheries. Technical Paper. No. 508. Rome, FAO. pp. 217–253.
- Tyler C.R. y Sumpter J.P. 1996. Oocyte growth and development in teleosts. Rev. Fish Biol. Fish., 6: 287-318.
- Wallace R.A. y Selman K. 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. Am. Zool., 21: 325-343.

- Wang H.Y., Weng C.F., Tu M.C. y Lee S.C. 2001. Synchronization of plasma sexual steroid concentrations and gonadal cycles in the sleeper, *Eleotris acanthopoma*. Zool. Studies, 40: 14–20.
- Warner R.R. 1982. Mating systems, sex change and sexual demography in the rainbow wrasse, *Thalassoma lucasanum*. Copeia, 3: 653-661.
- Watanabe W.O., Ellis S.C., Ellis E.P., Head W.D., Kelley C.D., Moriwake A., Lee C.S. y Bienfang P.K. 1995. Progress in controlled breeding of Nassau grouper (*Ephinephelus striatus*) broodstock by hormone induction. Aquaculture, 138: 205-219.
- Weltzien F.A., Andersson E., Andersson Ø., Shalchian-Tabrizie K., Norberg B. 2003. The brain–pituitary–gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (*Pleuronectiformes*). Comp. Biochem. Physiol 137(A): 447–477.
- Whiteman E.A., Jennings C.A. y Nemeth R.S. 2005. Sex structure and potential female fecundity in *Epinephelus guttatus* spawning aggregation: applying ultrasonic imaging. J. Fish Biol., 66: 983–995.
- Yaron Z. 1995. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. Aquaculture, 129: 49–73.
- Yaron Z., Gur G., Melamed P., Rosenfeld H., Elizur A. Levavi-Sivan B. 2003. Regulation of fish gonadotropins. Int. Rev. Cytol., 225: 131–185.
- Yaron Z. y Sivan B. 2006. Reproduction. Pages 343-386. In The Physiology of fishes. Evans, D.H. and Clairborne J.B. Eds. Third Edition. CRC, press Boca Raton.
- Yeh S.L., Kuo C.M., Ting Y.Y. y Chang C.F. 2003. Androgens stimulate sex change in protogynous grouper, *Epinephelus coioides*: spawning performance in sex-changed males. Comp. Biochem. Physiol. C., 135: 375–382.
- Zepeda Nuñez F. 2007. Expresión génica diferencial en el riñón de *Mycteroperca rosacea* por vacunación con ADN plasmídico. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Zohar Y., Breton B. y Fostier A. 1986. Short-term profiles of plasma gonadotropin and 17^a-hydroxy,20b-dihydroxyprogesterone levels in the female rainbow trout at the periovulatory period. Gen. and Comp. Endocrinol., 64: 189-198.
- Zanuy S. y Carillo M. 1987. La reproducción de los teleósteos y su aplicación en acuicultura. En: Espinosa de los Monteros J. y Labarta U. (Ed). Reproducción

- en acuicultura. Plan de formación de técnicos superiores en acuicultura. Industrias gráficas, Madrid, 1-102.
- Zanuy S., Prat F., Carrillo M. y Bromage N.R. 1995. Effects of constant photoperiod on spawning and plasma 17-oestradiol levels of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquat. Living Resour.* 8: 147-152.
- Zohar, Y. 1989. Endocrinology and fish farming: Aspects in reproduction, growth and smoltification. *Fish Physiol. Biochem.*, 7: 395-405.
- Zohar Y. y Mylonas C.C. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197: 99-136.

APÉNDICE I

1. Tampones y reactivos empleados para ELISA

1.1. Potassium Phosphate Buffer (PPB) 1 M

<u>Solución A</u> =	43.5 g K_2HPO_4 (PANREAC, BCN)	+	250 ml (DDW)
<u>Solución B</u> =	17 g KH_2PO_4 (PANREAC, BCN)	+	125 ml (DDW)

Ajustar el pH de la solución A hasta 7.4 con la solución B

1.2. Buffer de Reacción (RB)

100 ml de Potassium Phosphate Buffer (PPB) 1 M

0.1 g de NaN_3

23.4 g de NaCl

0.37 g EDTA

1 g BSA (Bovine Serum Albumine)

Llevar a 1 L con DDW

1.3. Buffer de Saturación

20 ml de PSB 1M

0.06 g de NaN_3

4.68 g NaCl

0.074 g de EDTA

0.6 g BSA

Llevar a 200 ml con DDW

1.4. Buffer de Lavado

40 ml de PPB 1M

2 ml Tween 20

Llevar a 4 L con DDW

1.5. Reactivo de Ellman (50X)

20 ml PPB 0.5 M (10 ml PPB + 10 ml DDW)

215 mg DTNB (5'5'dithio-bis-nitrobenzoic acid. $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$. D-830 SIGMA)

200 mg Acetilcolina ($\text{C}_7\text{H}_{16}\text{NOS}$. A-5751 SIGMA)

Alicuotar 400 μl y guardar protegidos de la luz a -20 en tubos oscuros.

* Para cada placa se diluye una alícuota en 19.6 ml de DDW justo antes de su uso. Se añadirán 200 μl pocillo⁻¹. Preservar en todo momento de la luz con papel aluminio.

APENDICE II

Tabla VIII. Valores máximos de esteroides sexuales encontrados en el plasma sanguíneo de la cabrilla sardinera *M. rosacea*, durante parte del 2004 y todo el 2005

Individuo (no)	Peso Inicial (Kg.)	Peso Final (Kg.)	E2 [ng/ml] Mes	T [ng/ml] Mes	11-KT [ng/ml] Mes	Sexo	DIO (μ m)
1D	3.14	3.66	3.215 Mayo/Jun	2.953 Noviembre	0.341 Mayo	Indet.	-
2B	0.38	0.48	2.790 Abr/Oct	3.096 Octubre	0.620 Agosto	Hembra	≈ 276
2F	0.84	1.00	2.599 Abril/Jun	2.249 Diciembre	0.514 Julio	Hembra	≈ 314
2J	0.72	0.78	2.565 Octubre	5.333 Septiembre	0.481 Junio	Hembra	≈ 569
1B	1.78	2.14	2.303 Agosto	3.305 Noviembre	0.428 Febrero	Hembra	≈ 225
2E	0.70	1.12	2.143 Junio	3.219 Noviembre	0.485 Agosto	Hembra	PV
1K	0.54	0.80	2.101 Junio	2.728 Noviembre	0.441 Mayo	Hembra	-
2H	1.20	1.52	2.015 Abr/Jun	6.5 Septiembre	8.669 Enero	Hembra	≈ 552
2C	0.92	1.22	1.934 Abril	5.231 Septiembre	0.977 Julio	Hembra	≈ 276/Abr ≈ 492/May
2D	0.82	0.82	1.881 Abril	2.85 Octubre	0.393 Octubre	Hembra	PV
2I	1.10	0.94	1.697 Agosto	5.586 Octubre	5.035 Septiembre	Hembra	maduros
1C	0.64	0.94	1.654 Mayo	2.363 Noviembre	0.499 Octubre	Hembra	-
1I	0.40	0.60	1.559 Julio	3.202 Noviembre	0.784 Noviembre	Indet.	-
2A	1.88	2.04	1.530 Junio	1.499 Mayo	3.357 Marzo	Indet. H/M	-
1F	0.40	0.70	1.472 Junio	2.011 Octubre	4.119 Junio	Indet.	-
1E	1.14	1.62	1.452 Junio	2.597 Abril	0.539 Noviembre	Hembra	≈ 235
2L	0.52	0.56	1.341 Septiembre	2.142 Septiembre	0.409 Julio	Hembra	PV
2K	0.42	0.66	1.297 Septiembre	4.015 Octubre	0.925 Enero	Hembra	≈ 574/Abr ≈ 393/May
1J	0.66	0.84	1.295 Mayo	4.563 Mayo	4.615 Mayo	Macho	-
1A	3.15	3.75	1.152 Agosto	1.667 Noviembre	1.589 Noviembre	Macho	-
1H	1.04	1.16	1.131 Junio	3.253 Octubre	5.388 Julio	Indet.	-

Continuación de la Tabla VIII

Individuo (no)	Peso Inicial (Kg.)	Peso Final (Kg.)	E2 (ng/ml) Mes	T (ng/ml) Mes	11-KT (ng/ml) Mes	Sexo	DIO (μ m)
1O	0.98	1.22	1.087 Enero	5.711 Enero	2.234 Febrero	Hembra	-
1N	0.86	1.16	1.082 Abril	1.465 Enero	0.282 Marzo	Macho	-
2G	0.24	0.66	1.010 Agosto	5.62 Julio	2.484 Junio	Hembra	\approx 337/Abr \approx 227/May
1G	0.38	0.58	0.980 Junio	4.754 Julio	6.015 Julio	Indet.	-
2M	0.74	0.90	0.953 Septiembre	3.077 Septiembre	0.716 Enero	Hembra	\approx 417
1L	0.36	0.48	0.949 Enero	3.049 Junio	5.218 Junio	Macho	-
2N	0.84	1.1	0.900 Abril	2.24 Marzo	5.042 Febrero	Hembra	PV
2O	0.26	0.32	0.362 Enero	0.691 Febrero	0.396 Febrero	Macho	-

Tabla IX. Concentración de esteroides sexuales durante el periodo experimental.

Fecha (mmaa)	Hembras			Machos			Indeterminados		
	E2	T	11-KT	E2	T	11-KT	E2	T	11-KT
Jul-04	0.121 ^f	0.929 ^d	0.275	0.525 ^{abcd}	0.824 ^{ab}	0.141 ^c	0.500 ^{abc}	0.757 ^{bc}	0.075
Sep-04	0.419 ^{cdef}	0.830 ^d	0.243	0.304 ^{bcd}	0.440 ^b	0.187 ^c	1.019 ^{ab}	0.365 ^c	0.090
Dic-04	0.354 ^{cdef}	1.030 ^d	0.819	0.559 ^{abcd}	0.568 ^{ab}	0.132 ^c	0.888 ^{abc}	0.476 ^c	0.070
Ene-05	0.350 ^{cdef}	1.526 ^{cd}	1.168	0.822 ^{ab}	1.079 ^{ab}	0.232 ^c	0.702 ^{abc}	0.948 ^{abc}	0.106
Feb-05	0.261 ^{def}	1.510 ^{cd}	0.920	0.456 ^{bcd}	1.000 ^{ab}	0.398 ^{bc}	0.606 ^{abc}	1.012 ^{abc}	0.219
Mar-05	0.162 ^{ef}	1.054 ^d	0.188	0.242 ^{bcd}	0.985 ^{ab}	0.598 ^{bc}	0.361 ^{abc}	0.930 ^{abc}	0.776
Abr-05	1.055 ^a	1.420 ^{cd}	0.200	0.833 ^{ab}	1.715 ^{ab}	0.986 ^{bc}	0.546 ^{abc}	0.940 ^{abc}	0.375
May-05	0.559 ^{bcde}	1.415 ^{cd}	0.321	0.642 ^{abc}	2.113 ^a	2.127 ^{ab}	0.992 ^{abc}	1.575 ^{abc}	0.646
Jun-05	0.720 ^{abc}	1.388 ^{cd}	0.827	0.653 ^{abc}	1.996 ^{ab}	3.401 ^a	1.232 ^a	1.276 ^{abc}	1.299
Jul-05	0.354 ^{cdef}	1.997 ^{bc}	0.797	1.091 ^a	0.757 ^{ab}	0.880 ^{bc}	0.885 ^{abc}	1.955 ^{ab}	2.178
Ago-05	0.668 ^{bcd}	1.901 ^{bc}	0.448	0.592 ^{abcd}	1.363 ^{ab}	1.418 ^{bc}	0.137 ^{bc}	0.922 ^{abc}	0.441
Sep-05	0.534 ^{bcde}	2.591 ^{ab}	1.098	0.022 ^{cd}	0.826 ^{ab}	1.496 ^{bc}	0.109 ^{bc}	1.388 ^{abc}	0.758
Oct-05	0.825 ^{ab}	2.796 ^a	0.427	0.000 ^d	1.355 ^{ab}	1.898 ^{abc}	0.114 ^{bc}	2.201 ^a	0.833
Nov-05	0.371 ^{cdef}	2.419 ^{ab}	0.816	0.000 ^d	1.805 ^{ab}	1.927 ^{abc}	0.052 ^c	1.956 ^{ab}	1.697

Letras distintas en cada columna representan diferencias estadísticas ($P < 0.05$).