



Programa de Estudios de Posgrado

[ESTUDIOS HORMONALES, BIOQUÍMICOS Y  
HEMÁTICOS DURANTE LA MADURACIÓN  
GONÁDICA EN LA CABRILLA SARDINERA  
*Mycteroperca rosacea* (STREETS, 1877)]

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

Presenta

[MARIO ALBERTO BURGOS ACEVES]

La Paz, Baja California Sur, [Julio] de [2011]

### ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 10 del Mes de Junio del 2011, 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:

**"Estudios Hormonales, Bioquímicos y Hemáticos durante la maduración gonádica en la cabrilla sardínera *Mycteroperca rosace* (Streets, 1877)"**

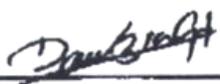
Presentada por el alumno:

**MARIO ALBERTO BURGOS ACEVES**

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN ACUICULTURA

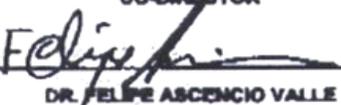
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

#### LA COMISION REVISORA

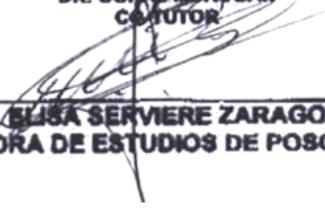
  
\_\_\_\_\_  
DRA. DAMITZIA GUERRERO TORROLERO  
DIRECTOR DE TESIS

  
\_\_\_\_\_  
DR. RAFAEL CAMPOS RAMOS  
CO-DIRECTOR

  
\_\_\_\_\_  
DRA. ADRIANA MUHLIA ALMAZAN  
CO-TUTOR

  
\_\_\_\_\_  
DR. FELIPE ASCENCIO VALLE  
CO-TUTOR

  
\_\_\_\_\_  
DR. GOPAL MURGAN  
CO-TUTOR

  
\_\_\_\_\_  
DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## COMITÉ TUTORIAL

**Dra. Danitzia A. Guerrero Tortolero**

Laboratorio de Endocrinología, CIBNOR (Unidad La Paz)

**Dr. Rafael Campos Ramos**

Laboratorio de Endocrinología, CIBNOR (Unidad La Paz)

**Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle**

Laboratorio de Patogénesis Microbiana, CIBNOR (Unidad La Paz)

**Dra. Adriana Muhlia Almazan**

Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos, CIAD-Hermosillo

**Dr. Gopal Murugan**

Laboratorio de Genética Molecular, CIBNOR (Unidad La Paz)

## COMITÉ REVISOR

**Dra. Danitzia A. Guerrero Tortolero**

Laboratorio de Endocrinología, CIBNOR (Unidad La Paz)

**Dr. Rafael Campos Ramos**

Laboratorio de Endocrinología, CIBNOR (Unidad La Paz)

**Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle**

Laboratorio de Patogénesis Microbiana, CIBNOR (Unidad La Paz)

**Dra. Adriana Muhlia Almazan**

Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos, CIAD-Hermosillo

**Dr. Gopal Murugan**

Laboratorio de Genética Molecular, CIBNOR (Unidad La Paz)

## Jurado en Examen de Grado

**Dra. Danitzia A. Guerrero Tortolero**

Laboratorio de Endocrinología, CIBNOR (Unidad La Paz)

**Dr. Rafael Campos Ramos**

Laboratorio de Endocrinología, CIBNOR (Unidad La Paz)

**Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle**

Laboratorio de Patogénesis Microbiana, CIBNOR (Unidad La Paz)

**Dra. Adriana Muhlia Almazan**

Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos, CIAD-Hermosillo

**Dr. Gopal Murugan**

Laboratorio de Genética Molecular, CIBNOR (Unidad La Paz)

**Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola (suplente)**

Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico, CIBNOR (Unidad La Paz)

## R E S U M E N

La cabrilla sardinera, *Mycteroperca rosacea*, es una especie endémica de México, la cual se ha estudiado con fines de acuicultura. Sin embargo, existe poca información en relación a su biología reproductiva, tanto en su medio silvestre así como en cautiverio, y no hay reportes relacionados con la disfunción reproductiva en confinamiento. En el presente trabajo se evaluaron concentraciones en plasma de  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), testosterona (T), 11-ketotestosterona (11-KT), cortisol (CORT), lípidos totales (LT), triglicéridos (TRI), colesterol (CHO) y glucosa (GLU) a las 0, 16 y 36 h, posterior a la inducción a la maduración final de ovocitos en cuatro grupos experimentales de hembras maduras de cabrilla sardinera: (1)  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  peso corporal (pc) de GnRH $\alpha$ , (2)  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  pc de LHRH $\alpha$ , (3)  $1000 \text{ UI Kg}^{-1}$  pc de hCG y (4) control placebo con solución salina. Los niveles de  $E_2$  y T se incrementaron significativamente y se mantuvieron en el grupo de hembras inyectadas con hCG a partir de las 16 h. Estas hembras también mostraron un incremento significativo en el diámetro de los ovocitos a las 36 h; a las 48 h las hembras se desovaron y produjeron huevos. Por lo tanto, los niveles de  $E_2$  y T fueron de utilidad como indicadores predictivos de respuesta a la maduración final de ovocitos. Los tratamientos de GnRH $\alpha$  y LHRH $\alpha$  no mostraron cambios significativos en estos esteroides sexuales durante los tiempos de muestreo. Sin embargo, el grupo control de peces fue significativamente menor en comparación a éstos a las 16 y 36 h, lo cual indicó una interrupción más marcada de la maduración final de ovocitos en los peces que no recibieron un tratamiento hormonal. Los niveles de 11-KT fueron similares a T pero sin mostrar cambios significativos en todos los grupos de peces, lo cual pudiera estar relacionado a una plasticidad potencial de reversión sexual. Los niveles de CORT se mostraron elevados al tiempo 0 h y permanecieron sin cambios significativos en todos los grupos experimentales durante los tiempos de muestreo. Por lo tanto, el estrés elevado de los peces se atribuyó a la captura silvestre y la subsecuente transportación y manipulación antes del tratamiento hormonal. No se encontró evidencia de que el CORT se incrementara debido a la aplicación de los tratamientos hormonales o bien a la manipulación. Los análisis bioquímicos en plasma revelaron que LT, TRI y GLU disminuyeron significativamente ya sea a las 16 o a las 36 h, tanto en el grupo control así como en los grupos experimentales, mientras que el CHO no mostró cambios

significativos. Ninguno de estos componentes metabólicos fue útil como indicador predictivo a la maduración final de ovocitos en esta especie. El análisis en sangre periférica mostró eritroblastos basófilos, policromáticos y ortocromáticos, que fueron identificados como eritrocitos inmaduros que se convierten en eritrocitos maduros. Los tipos de leucocitos incluyeron los linfocitos; tres tipos de granulocitos (basófilos, eosinófilos y neutrófilos); monocitos; macrófagos con forma amiboidea, y trombocitos. El análisis de estas células en cabrillas en cautiverio, mostró que las hembras pudieran ser más susceptibles a enfermedades, por el incremento significativo de linfocitos y granulocitos observados, en comparación con los machos. Por otro lado, se observó un incremento significativo de leucocitos (leucofilia) y trombocitos (trombofilia) en hembras maduras silvestres (primavera), comparado con hembras inmaduras (verano). La leucofilia en hembras maduras ocurrió aparentemente después de un incremento de linfocitos y trombocitos, seguido de un incremento diferencial de monocitos y granulocitos. En el caso de los machos maduros silvestres, la granulofilia y trombofilia fueron evidentes. Estas observaciones sugieren una coordinación en la actividad endocrina-inmune durante la reproducción, en donde después de un evento de desove, los leucocitos se infiltran en tejido gonádico procedentes de la sangre periférica para proveer de vigilancia inmune y actividad de fagocitosis, mientras que los esteroides sexuales retroalimentan y estimulan la vitelogénesis, en preparación del siguiente desove. La abundancia de leucocitos pudiera estar también involucrada en la reabsorción de la gónada cuando la reproducción finaliza. Los valores de conteo celular sanguíneo, eritroblastos, y hematocrito en cabrillas maduras en primavera, fueron significativamente más bajos que las cabrillas inmaduras en verano, lo cual sugiere una anorexia ocasionada por el comportamiento reproductivo.

**Palabras clave:** *Mycteroperca rosacea*, disfunción reproductiva, leucocitos.

## A B S T R A C T

The leopard grouper, *Mycteroperca rosacea*, is an endemic species of Mexico, which has been studied for aquaculture purposes. However, little information exists regarding its reproductive biology in the wild and in captivity, and there are not reports concerning its reproductive dysfunction in confinement. In this study, plasma concentrations of estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>), testosterone (T), 11-ketotestosterone (11-KT), cortisol (CORT), total lipids (TL), triglycerides (TRI), cholesterol (CHO), and glucose (GLU) were recorded at 0, 16, and 36 h after inducing final oocyte maturation in four groups of wild mature female leopard grouper *Mycteroperca rosacea*, by using (1) 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  body weight (bw) of GnRHa, (2) 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  bw of LHRHa, (3) 1000 UI  $\text{kg}^{-1}$  bw of hCG, and (4) a control saline solution. Plasma concentrations of E<sub>2</sub> and T significantly increased and peaked in the fish group injected with hCG at 16 h. These females showed a significant increase in oocyte diameter at 36 h; by 48 h the females were stripped and yielded eggs. Therefore, plasma concentrations of E<sub>2</sub> and T were useful predictive markers to assess a response towards final oocyte maturation. GnRHa and LHRHa treatments did not show significant changes of these sexual steroids during the sample times. However, the control fish group was significantly lower than them at 16 and 36 h, which indicated a faster disruption of final oocyte maturation in fish not receiving hormonal treatment. Levels of 11-KT were similarly as high as T and showed no significant changes in all fish groups, which may reveal a potential plasticity of sex change. Levels of CORT were high from time zero and remained without significant changes in all fish groups during the sample times. Therefore, the level of stress recorded was attributed to capture in the wild and further transportation and manipulation before hormonal treatment. Repeated handling during hormonal treatments did not add additional stress to fish. Blood biochemistry showed that TL, TRI, and GLU significantly decreased in all fish groups at 16 or 36 h, whereas CHO remained without significant changes. None of these biochemical components was useful to predict final oocyte maturation in this species. Peripheral blood analysis showed basophilic, polychromatic, and orthochromic erythroblasts that were observed as immature erythrocytes that develop into mature erythrocytes. Types of leukocytes included lymphocytes; three types of granulocytes (basophiles, eosinophiles, and neutrophiles); monocytes; and a specialized amoeboid-like

macrophage, and thrombocytes. The analysis of these cells in captive leopard grouper, showed that females could be more susceptible to illnesses, by the significant increment of lymphocytes and granulocytes observed, in comparison with males. On the other hand, a significant increase of leukocytes (leukophilia) and thrombocytes (thrombophilia) was observed in wild mature females (spring), when compared to wild immature females (summer). Leukophilia in mature females apparently occurred after an increase of lymphocytes and thrombocytes, followed by a differential increase of monocytes and granulocytes. In mature males, granulophilia and thrombophilia were evident. These observations suggest coordination of endocrine-immune activity during reproduction, where, after one spawning event, leukocytes infiltrate the gonad tissue from the peripheral blood to aid with immune surveillance and phagocyte activity, while a feedback of sex steroids and vitellogenesis occurs in preparation for the next spawning. An abundance of leukocytes may also aid in gonad re-absorption when reproduction ceases. Blood cell counts, erythroblasts, and haematocrit of mature groupers in spring were significantly lower than immature groupers in summer, suggesting mild anorexia induced by reproductive behavior.

**Palabras clave:** *Mycteroperca rosacea*, reproductive disruption, leukocytes.

**D E D I C A T O R I A**

A mis hijos Fernando y Alberto Kaleb

## A G R A D E C I M I E N T O S

Este trabajo fue desarrollado y concluido gracias al apoyo de muchas personas. A todos y cada uno mi más grande y sincero agradecimiento. Con admiración y respeto.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado (Registro No. 213324).

A todo el personal del Programa de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR): Dra. Elisa Serviere Zaragoza (directora de Posgrado), Lic. Osvelia Ibarra, Lic. Leticia González, Lic. Ma. Guadalupe Sánchez Vázquez, Lic. Claudia Elizabeth Olachea León, Lic. Tania Verónica Nuñez Valdez, Ira Fogel, Ing. Horacio Sandoval Gómez e Ing. José Manuel Melero Astorga. Por todo el apoyo logístico otorgado.

De manera muy especial mi gratitud para mis directores de Tesis: Dra. Danitizia A. Guerrero Tortolero y al Dr. Rafael Campos Ramos, quienes me apoyaron, brindaron sus conocimientos, amistad y comprensión cuando fuese necesario. Excelentes investigadores y personas.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Felipe Ascencio Valle, Dra. Adriana Muhlia Almazan y Dr. Gopal Murugan por haber aceptado andar conmigo en esta aventura. Por sus comentarios, sugerencias y experiencia que permitieron el enriquecimiento de mi trabajo.

Al equipo de redes y de manera especial al Lic. Pedro Tsuchiya por la excelente coordinación y desarrollo de videoconferencias con mi Comité Tutorial y apoyo en informática.

A los responsables de los siguientes laboratorios en el CIBNOR, por su apoyo así como compartirme de su experiencia, tiempo y espacio: M.C. M<sup>a</sup> del Carmen Rodríguez Jaramillo (histología e histoquímica); M.C. Roberto Hernández (Bioquímica Fisiológica). A los técnicos: Ma. de Jesús Romero, Jorge Angulo Calvillo, Enrique Calvillo Espinoza, José Gilberto Colado Durán, Jorge León Sandoval Soto, Adriana Landa. A todos ellos mil gracias.

A mi familia, desde lo más profundo de mi corazón mi eterna gratitud por su cariño y apoyo incondicional. Gracias a la vida...

A mis entrañables amigos de toda una vida: Jesús, Cristina, Maricela, Bárbara, Giovanni, Gorette. Por su amistad, confianza, cariño, consejos y regaños. Siempre en mi corazón.

## C O N T E N D I D O

Acta de liberación de tesis.....	i
Conformación de Comité Tutorial.....	ii
Resumen.....	iii
Abstract.....	v
Dedicatoria.....	vii
Agradecimientos.....	viii
Contenido.....	ix
Lista de Tablas.....	xiii
Lista de Figuras.....	xiv
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Generalidades de la especie.....	1
1.2 Reproducción de teleósteos.....	2
1.2.1 Gametogénesis.....	4
1.2.2 Control Endocrino de la Reproducción.....	6
1.2.2.1 Esteroides Sexuales.....	9
1.3 Disfunción Reproductiva en teleósteos.....	11
1.3.1 Disfunción Reproductiva en la piscicultura.....	11
1.4 Estrés en teleósteos.....	13
1.5 Bioquímica Sanguínea en teleósteos.....	16
1.6 Sistema Inmunológico en Teleósteos.....	17
1.7 Hematología en Teleósteos.....	18
1.7.1 Sangre de teleósteos.....	20
1.7.2 Plasma Sanguíneo.....	20
1.7.3 Elementos Formes o Figurados.....	21
1.7.3.1 Eritrocitos.....	21

1.7.3.2 Leucocitos.....	23
1.7.3.2.1 Linfocitos.....	24
1.7.3.2.2 Monocitos/Macrófagos.....	25
1.7.3.2.3 Granulocitos.....	26
1.7.3.2.3.1 Neutrófilos.....	27
1.7.3.2.3.2 Basófilos.....	27
1.7.3.2.3.3 Eosinófilos.....	28
1.7.3.2.4 Trombocitos.....	29
1.8 Avances en acuicultura de la cabrilla sardinera.....	30
1.9 Justificación.....	32
<b>2. HIPÓTESIS.....</b>	<b>35</b>
<b>3. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>37</b>
<b>4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>37</b>
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
5.1 Captura de ejemplares.....	38
5.2 Diseño Experimental.....	38
5.2.1 Tratamientos hormonales para la maduración final.....	38
5.2.2 Hematología en cabrilla sardinera silvestre.....	39
5.3 Identificación de cabrillas maduras y toma de sangre.....	42
5.4 Histología.....	43
5.5 Cuantificación Esteroides Sexuales y Cortisol.....	44
5.6 Bioquímica Sanguínea.....	46
5.6.1 Cuantificación de Lípidos Totales.....	46
5.6.2 Cuantificación de Triglicéridos.....	47
5.6.3 Cuantificación de Colesterol.....	48
5.6.4 Cuantificación de Glucosa.....	48

5.7 Hematología.....	49
5.7.1 Identificación Células Sanguínea.....	50
5.7.2 Determinación de Hematocrito.....	50
5.7.3 Conteo Celular Sanguíneo.....	50
5.7.4 Porcentaje de Células Sanguíneas.....	51
5.7.5 Conteo diferencial de Leucocitos.....	51
5.8 Análisis Estadísticos.....	52
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
6.1 Datos de captura de Cabrilla Sardinera durante el 2009.....	53
6.2 Efecto de las terapias hormonales en el tamaño del ovocito.....	53
6.2.1 Histología de hembras maduras.....	54
6.3 Cuantificación Esteroides Sexuales y cortisol.....	57
6.3.1 17 $\beta$ -estradiol y Testosterona durante la maduración final de ovocito.....	57
6.3.1.1 17 $\beta$ -estradiol y Testosterona estacionales.....	59
6.3.2 11-Ketotestosterona.....	60
6.3.3 Cortisol.....	61
6.4 Cuantificación Bioquímica Sanguínea.....	62
6.4.1 Lípidos Totales.....	62
6.4.2 Triglicéridos.....	63
6.4.3 Colesterol.....	64
6.4.4 Glucosa.....	65
6.5 Tipos de células Sanguíneas.....	67
6.6 Hematología.....	71
6.6.1 Hematocrito en Cabrilla Sardinera silvestre.....	71
6.6.2 Hematocrito en Cabrilla Sardinera en cautiverio.....	71
6.6.3 Conteo de Células Sanguíneas en Cabrilla Sardinera silvestre.....	72

6.6.4	Conteo de Células Sanguíneas en Cabrilla Sardinera en cautiverio.....	72
6.6.5	Porcentaje de Células Sanguíneas en Cabrilla Sardinera silvestre en primavera y verano.....	73
6.6.6	Porcentaje de Células Sanguíneas en Cabrilla Sardinera en cautiverio.....	79
<b>7.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>83</b>
7.1	Estatus de maduración en las hembras experimentales.....	83
7.2	Efecto de los tratamientos hormonales en el tamaño de ovocito.....	83
7.3	Efecto de los tratamientos hormonales en la síntesis de hormonas.....	84
7.4	Efecto del cortisol en la maduración final de ovocitos.....	90
7.5	Perfiles bioquímicos en las hembras experimentales.....	91
7.6	Hematología en cabrilla sardinera silvestre y en cautiverio.....	93
7.6.1	Descripción de las células sanguíneas de cabrilla sardinera.....	93
7.6.2	Eritropoiesis en cabrilla sardinera.....	94
7.6.3	Hematocrito y conteo de células sanguíneas en cabrilla sardinera.....	95
7.6.4	Conteo diferencial de leucocitos en hembras y machos de cabrilla sardinera en cautiverio.....	96
7.6.5	Conteo diferencial de leucocitos en hembras y machos de cabrilla sardinera silvestre.....	97
7.6.5.1	Linfocitos y trombocitos.....	97
7.6.5.2	Granulocitos y monocitos.....	98
7.6.5.3	El papel de los leucocitos durante la maduración de la cabrilla sardinera...	100
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>102</b>
<b>9.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>103</b>
<b>10.</b>	<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>104</b>
<b>11.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>130</b>
	Anexo I Rutina de tinción para Hematoxilina-Eosina.....	130
	Anexo II Tablas con niveles de Testosterona, 17 $\beta$ -estradiol, 11-Ketotestosterona y Cortisol.....	131

Anexo III Tablas con niveles de Lípidos Totales, Triglicéridos, Colesterol y Glucosa....	132
Anexo IV Artículos.....	131

## L I S T A D E T A B L A S

Tabla	Título	Página
<b>Tabla I</b>	Tamaño de ovocito (Media $\pm$ Desviación estándar) en la captura y a las 36 h de los tres tratamientos hormonales y control placebo en cabrilla sardinera <i>Mycteroperca rosacea</i> .	56
<b>Tabla II</b>	Valores de estradiol y testosterona (Media $\pm$ Desviación estándar) en cabrillas maduras en primavera y cabrillas inmaduras en verano de ambos sexos.	60
<b>Tabla III</b>	Dimensión (Media $\pm$ Error estándar) de las células sanguíneas presentes en sangre de la cabrilla sardinera.	67
<b>Tabla IV</b>	Dimensión (Media $\pm$ Error estándar) del núcleo de los tipos celulares sanguíneos presentes en la cabrilla sardinera.	68
<b>Tabla V</b>	Valores (Media $\pm$ Desviación estándar) de hematocrito de ejemplares de cabrilla sardinera silvestre en estadio reproductivo e inmaduro.	71
<b>Tabla VI</b>	Valores (Media $\pm$ Desviación estándar) de hematocrito de ejemplares de cabrilla sardinera inmadura en cautiverio.	71
<b>Tabla VII</b>	Valores (Media $\pm$ Desviación estándar) del conteo de células sanguíneas de ejemplares de cabrilla sardinera silvestre en estadio reproductivo e inmaduro.	72
<b>Tabla VIII</b>	Valores (Media $\pm$ Desviación estándar) del conteo de células sanguíneas de ejemplares de cabrilla sardinera inmadura en cautiverio.	72

## L I S T A   D E   F I G U R A S

<b>Figura</b>	<b>Nombre</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b>	Patrones de color presentes en la cabrilla sardinera.	2
<b>Figura 2</b>	Esquematación de la espermatogénesis y ovogénesis en vertebrados.	5
<b>Figura 3</b>	Esquema de la regulación neuroendocrina en la secreción de GtH II en hembras.	7
<b>Figura 4</b>	Estresores químicos, físicos y percibidos que actúan sobre el pez provocando posibles cambios fisiológicos, los cuales están agrupados en respuestas primaria, secundaria y terciaria.	13
<b>Figura 5</b>	Esquema representativo de un eritrocito maduro y un eritrocito inmaduro de teleósteos	22
<b>Figura 6</b>	Esquema de los diferentes tipos de leucocitos o glóbulos blancos presentes en teleósteos	23
<b>Figura 7</b>	Esquema de cuatro morfologías principales de trombocitos en teleósteos	29
<b>Figura 8</b>	Inyección intramuscular en la parte superior dorsal por encima de la línea lateral	39
<b>Figura 9</b>	Diagrama de flujo del diseño experimenta para el desarrollo de los tratamientos hormonales con GnRH <sub>a</sub> , LHRH <sub>a</sub> y hCG	40
<b>Figura 10</b>	Diagrama de flujo del diseño experimental para el análisis de células sanguíneas utilizando hembras y machos silvestres y en cautiverio de cabrilla sardinera.	41
<b>Figura 11</b>	Biopsia gonadal realizada a los ejemplares capturados con cánula de polietileno	42
<b>Figura 12</b>	Extracción de sangre de la vena cauda con jeringa heparinizada de 3 mL en hembras seleccionadas.	43
<b>Figura 13</b>	Esquematación de un inmunoensayo enzimático competitivo	46
<b>Figura 14</b>	Elaboración de un Frotis sanguíneo de cabrilla sardinera	49
<b>Figura 15</b>	Biopsia realizada a las hembras capturadas al momento de su llegada al laboratorio	53
<b>Figura 16</b>	Corte histológico de hembra madura de cabrilla sardinera	54
<b>Figura 17</b>	Foto-micrografía de corte histológico de gónada de hembra madura de cabrilla sardinera en tinción de Hematoxilina-Eosina.	55

## L I S T A D E F I G U R A S (CONTINUACIÓN)

Figura	Nombre	Página
<b>Figura 18</b>	Niveles (Media $\pm$ Desviación estándar) de Estradiol en plasma de hembras silvestres de cabrillas sardineras experimentales	58
<b>Figura 19</b>	Niveles (Media $\pm$ Desviación estándar) de Testosterona en plasma de hembras silvestres de cabrillas sardineras experimentales	59
<b>Figura 20</b>	Niveles (Media $\pm$ Desviación estándar) de 11-Ketotestosterona en plasma de hembras silvestres de cabrilla sardinera experimentales	61
<b>Figura 21</b>	Niveles (Media $\pm$ Desviación estándar) de Cortisol en plasma de hembras de cabrilla sardinera experimentales	62
<b>Figura 22</b>	Niveles (Media $\pm$ Desviación estándar) de Lípidos Totales en plasma de hembras de cabrilla sardinera experimentales	63
<b>Figura 23</b>	Niveles (Media $\pm$ Desviación estándar) de Triglicéridos en plasma de hembras de cabrilla sardinera experimentales	64
<b>Figura 24</b>	Niveles (Media $\pm$ Desviación estándar) de Colesterol en plasma de hembras de cabrilla sardinera experimentales	65
<b>Figura 25</b>	Niveles (Media $\pm$ Desviación estándar) de Glucosa en plasma de hembras de cabrilla sardinera experimentales	66
<b>Figura 26</b>	Tipos de células sanguíneas presentes en hembras de cabrilla sardinera <i>Mycteroperca rosacea</i>	70
<b>Figura 27</b>	Porcentajes de eritrocitos en hembras y machos silvestres de cabrilla sardinera <i>Mycteroperca rosacea</i> en estadio maduro e inmaduro. A) Eritrocitos maduros; B) Eritroblastos basófilos y poli/ortocromáticos	74
<b>Figura 28</b>	Proporciones de Leucocitos y Trombocitos en hembras y machos silvestres de la cabrilla sardinera en estadio maduro e inmaduro	75
<b>Figura 29</b>	Primer Perfil diferencial de leucocitos y trombocitos de hembras maduras <i>versus</i> Perfil de hembras inmaduras de <i>Mycteroperca rosacea</i>	76
<b>Figura 30</b>	Primer Perfil diferencial de leucocitos y trombocitos <i>versus</i> Segundo perfil de hembras maduras de <i>Mycteroperca rosacea</i>	77
<b>Figura 31</b>	Primer perfil diferencial de leucocitos y trombocitos <i>versus</i> tercer perfil de hembras maduras de <i>Mycteroperca rosacea</i>	78
<b>Figura 32</b>	Perfil diferencial de Leucocitos Machos maduros <i>versus</i> Perfil Machos inmaduros silvestres de <i>Mycteroperca rosacea</i>	79
<b>Figura 33</b>	Perfil de eritrocitos en hembras y machos inmaduros cautivos de la cabrilla sardinera. A) Porcentaje de eritrocitos maduros; B) Porcentaje de eritroblastos basófilos y poli/ortocromáticos	80
<b>Figura 34</b>	Porcentaje de Leucocitos y Trombocitos en hembras y machos inmaduros cautivos de la cabrilla sardinera <i>Mycteroperca rosacea</i>	81
<b>Figura 35</b>	Perfil de leucocitos y Trombocitos en hembras y machos cautivos e inmaduros de la cabrilla sardinera <i>Mycteroperca rosacea</i>	82

# 1. INTRODUCCIÓN

## *1.1 Generalidades de la Especie*

La cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* (Streets 1877) es una especie importante para la pesca artesanal y deportiva dentro de la zona del Golfo de California (Salas et al. 2003). Es un pez aceptado en el mercado local por la alta calidad de su carne (Gracia-López 2004a). Debido a su elevada pesquería, ésta especie en los últimos diez años ha visto mermada su población natural, decrementándose el esfuerzo pesquero (Salas et al. 2004). Esta especie ha sido estudiada en el Programa de Acuicultura del CIBNOR durante una década con fines de incorporarla como una especie potencial a ser cultivada.

*M. rosacea* al igual que la mayoría de los meros (subfamilia Epinephelidae), es una especie de cuerpo robusto y algo comprimido. Alcanzan una talla máxima de 70 cm de longitud total aunque se han capturado individuos de un metro (Díaz-Uribe et al. 2001). Presentan dos patrones de color muy distintivos (Fig. 1); el primero, y el más común, consiste de una tonalidad de fondo verdosa a pardo-grisácea con manchitas pardo-rojizas y líneas o manchas pálidas irregulares y bordes de las aletas blancos. El segundo, es un color de fondo amarillo-naranja vivo, frecuentemente adornado con unas pocas manchas negras irregulares y se presenta sólo en un 5% o menos dentro de la especie (Fischer et al. 1995).

La cabrilla sardinera es una especie endémica de México; se distribuye en la costa suroriental de la Península de Baja California, el Golfo de California, costas de Nayarit y Jalisco. Habita preferentemente en áreas rocosas cerca de la línea de costa a una profundidad no mayor de 50 m (Fischer et al. 1995). La temporada reproductiva para la cabrilla sardinera se ha establecido durante el periodo comprendido entre marzo a junio (Salas et al. 2003).



**Figura 1.** Patrones de color presentes en la cabrilla sardinera

Las hembras presentan un desarrollo gonadal asincrónico por grupo, por tanto, se consideran desovadoras parciales. La edad en que adquieren su madurez reproductiva es de 3 años en promedio, no obstante, peces de este tamaño raramente participan en los eventos de desove. Las hembras que participan en los desoves son de una edad promedio de 5 a 7 años y los machos de entre los 7 u 8 años (Salas et al. 2003; Erisman et al. 2007).

### ***1.2 Reproducción en teleósteos***

La reproducción en peces es regulada por factores ambientales externos que activan mecanismos endocrinos internos (Rottman et al. 1991). Esto implica una perfecta comunicación entre los tejidos involucrados (Hazon y Balment 1998) así como una sincronización de los individuos entre sí y de éstos con las variaciones ambientales (Muñoz-Cueto 2005). El sistema endocrino reproductivo, conformado por el hipotálamo, la glándula pituitaria y la gónada, es el encargado de descifrar señales tanto externas como internas para dar inicio y término a la maduración gonádica y liberación de los gametos. El hipotálamo y la glándula pituitaria controlan la reproducción a un nivel neuroendocrino y están regulados constantemente a través de un mecanismo de retroalimentación por las hormonas de la gónada. Dicha acción coordinada regula los cambios morfológicos y el comportamiento reproductivo, así como la movilización de reservas energéticas para el

desarrollo ovárico (Habibi y Andreau-Vieyra 2007). Dada la complejidad del proceso reproductivo, se requieren profundos ajustes metabólicos asociados, no sólo con la maduración de los gametos, sino también con posibles cambios de comportamiento según el hábitat durante la temporada de reproducción (Hoar 1969).

Sin embargo, no todos los peces sexualmente maduros se reproducen ya que existen diversos factores que pueden inhibir o suprimir parcial o totalmente la actividad endocrina reproductiva. En acuicultura, es común que todas o casi todas las especies de peces en cultivo presenten algún grado de disfunción reproductiva, siendo las hembras más susceptibles pudiendo no alcanzar la maduración final del ovocito. Este fenómeno puede deberse a la ausencia de algún estímulo ambiental apropiado y/o por la presencia de algún factor estresante impuesto por el cautiverio mismo (Schreck et al. 2001).

El estrés puede provocar cambios bioquímicos, fisiológicos, morfológicos y/o conductuales en los peces y en consecuencia llegar a alterar el sistema inmune repercutiendo directa o indirectamente en el resto de la fisiología del pez. Cambios significativos en el ambiente pueden resultar en una inmunosupresión que al combinarse con eventos fisiológicos como la migración o el desove pudieran agravar el efecto (Donaldson 1990). El incremento de cortisol en sangre está relacionado con una inhibición de los esteroides sexuales. Se ha demostrado que los esteroides sexuales además de jugar un papel esencial durante el proceso reproductivo, intervienen en procesos tan importantes como el crecimiento, la digestión e inmunidad. Un ejemplo de ello es la actividad del  $17\beta$ -estradiol y/o la testosterona, donde estos esteroides afectan la respuesta inmune innata y adaptativa, mientras que algunas citoquinas están relacionadas con el crecimiento y desarrollo de los folículos, la ovulación, el desarrollo lúteo, espermatogénesis y esteroidogénesis en mamíferos (Tort et al. 2003, 2004; Cuesta et al. 2007). El estudio del sistema inmune en peces es un campo relativamente nuevo y se han utilizado algunas especies de teleósteos como modelos para comprender su funcionamiento ya que se considera como una red compleja y sofisticada con respuesta a multinivel (Whyte 2007). Sin embargo, la existencia de una interconexión entre el sistema endocrino y el sistema inmunológico durante la etapa reproductiva ha recibido poca atención, pese que se ha

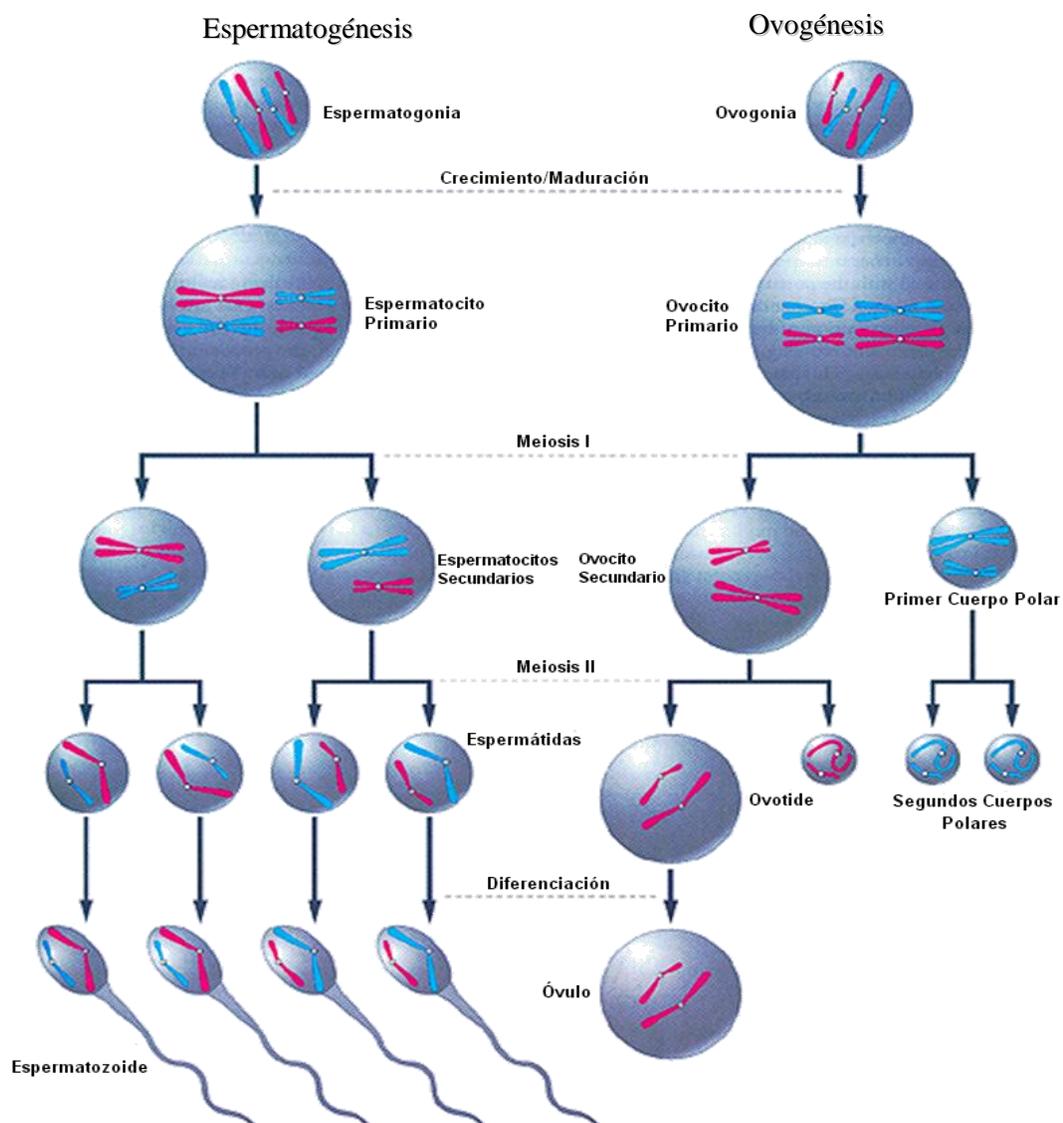
demostrado la síntesis de hormonas y citoquinina que regulan y controlan el funcionamiento de ambos sistemas dentro un proceso de retroalimentación (Harris y Bird 2000; Fast et al. 2008). Algunas sustancias inmunes actúan sobre el sistema endocrino bajo condiciones de estrés, utilizando principalmente péptidos de la familia de la hormona liberadora corticotrópica (Verburg-Van Kemenade y Schreck 2007).

### *1.2.1 Gametogénesis*

En los peces teleósteos, al igual que el resto de los seres vivos, la reproducción sexual es una de las etapas más importantes dentro de su ciclo de vida, ya que de esta forma se asegura la perpetuación de la especie mediante la transferencia de la información genética a las futuras generaciones (Hazon y Balment 1998). Dentro de la reproducción, la gametogénesis, puede considerarse como una de las etapas primordiales, ya que a partir de células germinales se originarán los gametos (Fig. 2), que al unirse darán origen a un nuevo individuo con características semejantes a los padres. Estos gametos poseen cuatro características específicas que los diferencian del resto de las células presentes en el organismo, 1) Pertenecen a la estirpe germinal y son diferenciadas desde el comienzo de la ontogénesis; 2) tienen una evolución propia que concluirá a la forma haploide; 3) Sufren una diferenciación especial, en células masculinas (espermatogénesis) o femeninas (ovogénesis) y 4) su finalidad es el fenómeno de la fecundación (Houillon 1972).

De manera general, la gametogénesis en teleósteos puede dividirse en dos grandes etapas:

- 1) Proliferación, crecimiento y diferenciación de los gametos: ovocitos y espermatocitos (vitelogénesis y espermatogénesis).
- 2) Maduración de los ovocitos y espermatocitos y preparación para su liberación; (maduración final del ovocito y espermiación).



**Figura 2.** Esquematización de la espermatogénesis y ovogénesis en vertebrados. Tomado y traducido de <http://ilmukeperawatan.wordpress.com/2008/06/24/56/>

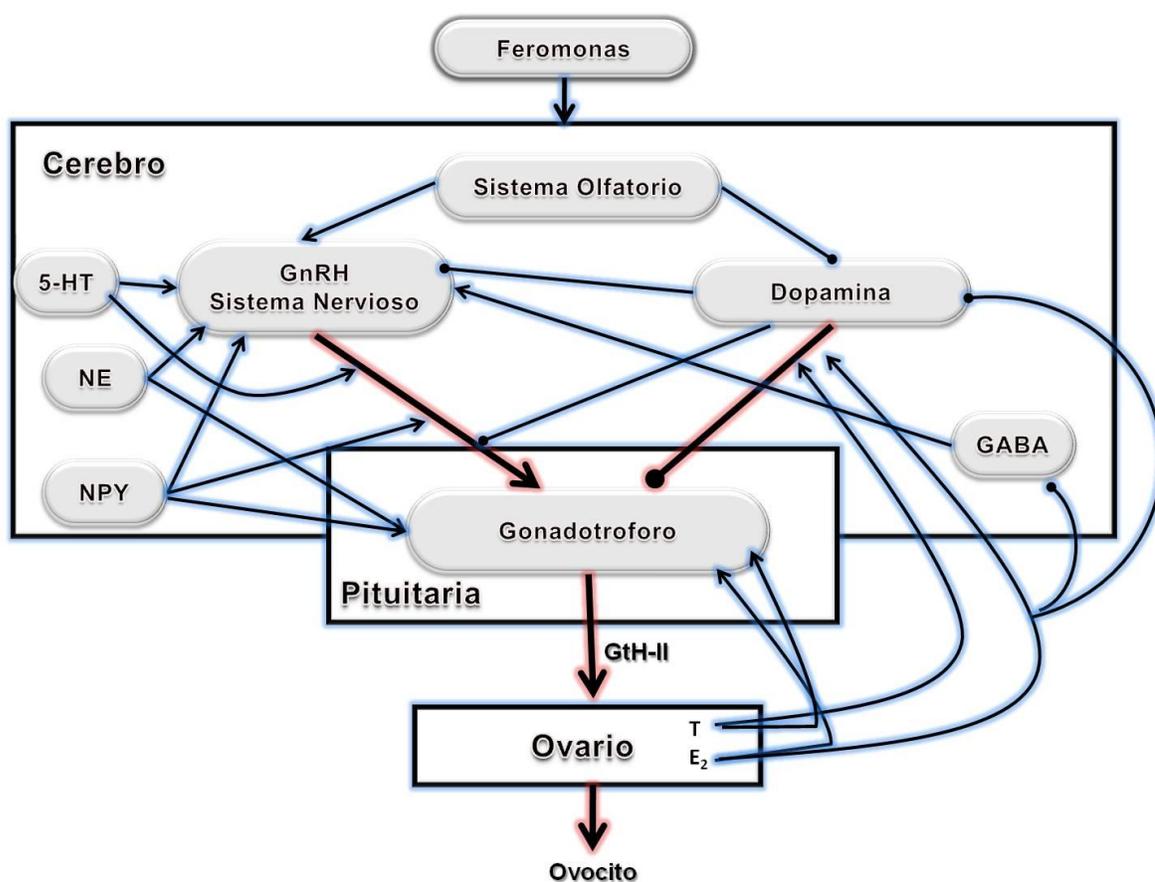
El estudio de la gametogénesis, a escala celular, provee información necesaria sobre la organización funcional de la gónada y la producción de las células gaméticas. Dado que el control de la gametogénesis está regulado por factores ambientales y neuroendocrinos, estos constituyen la comprensión básica de los mecanismos fisiológicos ambientales que controlan el proceso reproductivo (Brown-Peterson et al. 1988; Kokokiris et al. 2000).

### 1.2.2 Control Endocrino de la Reproducción

Para que la reproducción en teleósteos cumpla con su objetivo de producir prole, es necesaria una sincronización de los reproductores entre sí y de éstos con las variaciones de los factores ambientales. En este sentido, los individuos deben contar con un sistema capaz de procesar informaciones procedentes tanto del medio exterior como del interior del organismo. La integración de los factores externos e internos conlleva a un estado endocrino idóneo que regule, a su vez, todos los eventos fisiológicos que conducirán a la maduración final y desove (Muñoz-Cueto 2005). Esto se logra por la acción del sistema nervioso y el endocrino; sistemas clave para el mantenimiento de la homeostasis. El sistema nervioso genera repuestas rápidas y de corta duración; el sistema endocrino, en cambio, actúa en forma más lenta y con efectos más prolongados o duraderos utilizando mensajeros químicos conocidos como hormonas. Al igual que en mamíferos, estos mensajeros juegan un papel importante en el proceso reproductivo. Son sintetizados por glándulas endocrinas, liberados al torrente sanguíneo y dirigidos a un tejido u órgano específico, donde producen una modificación o alteración de su funcionamiento para conseguir un determinado efecto. Son varios los tejidos y órganos (Hipotálamo, Hipófisis, Timo, Glándula Tiroides, Glándula Paratiroides, Glándula Suprarrenales, Glándula Pituitaria, Páncreas, Gónadas) que conforman el sistema endocrino (Muñoz-Cueto 2005). Sin embargo, los principales órganos endocrinos involucrados en el proceso reproductivo en los peces teleósteos son el hipotálamo, la glándula pituitaria ó hipófisis y la gónada que en conjunto conforman el eje *Hipotálamo-Pituitaria-Gónada* (HPG) (Van Der Kraak et al. 1998; Mylonas y Zohar 2001).

Una vez iniciada la temporada reproductiva, se echa andar el eje HPG iniciando con la integración y traducción de los estímulos ambientales (fotoperiodo, temperatura, lluvias, presión atmosférica, mareas, alimento, etc.) y de los cambios sociales (densidad poblacional, presión de depredación, feromonas) en señales electroquímicas, por fotoreceptores y quimiorreceptores del órgano pineal; perteneciente al sistema nervioso central (Ekström y Meissl 1997; Muñoz-Cueto 2005). El sistema nervioso central responde por medio de circuitos neuronales precisos, mediante la liberación de determinadas

neurohormonas en el hipotálamo conocidas como hormonas liberadoras de gonadotropinas (GnRH) o gonadoliberinas que en conjunto con otros factores cerebrales (Fig. 3), como el factor inhibidor de la liberación de gonadotropinas, identificado como dopamina, y de otras moléculas que intervienen en esta regulación, como ciertos neuropéptidos (péptidos opioides, neuropéptido Y, galanina, colecistoquinina, polipéptido activador de la adenilil ciclasa de pituitaria), monoaminas (noradrenalina, serotonina) y aminoácidos neurotransmisores (ácido  $\gamma$ -aminobutírico, taurina, ácido glutámico, ácido aspártico, alanina), regulan la actividad de la hipófisis (Muñoz-Cueto 2005).



**Figura 3.** Esquema de la regulación neuroendocrina en la secreción de GtH II en hembras. Las líneas con flecha indican acción estimulante; líneas con punto indican acción inhibitoria. Abreviaciones: E<sub>2</sub>, estradiol; GABA, ácido  $\gamma$ -aminobutírico; GnRH, hormona liberadora de gonadotropinas; NPY, neuropeptido Y; NE, norepinefrina; 5-HT, serotonina; T, testosterona. Tomado de Peter y Yu 1997.

El neuropéptido GnRH, es el principal agente en la síntesis y liberación de GtHs (Sherwood et al. 1983) así como clave en el inicio y mantenimiento del proceso reproductivo (Somoza et al. 2002). También se le relaciona en la modulación de la función celular, proliferación o apoptosis celular en gónada, así como en el comportamiento reproductivo de los peces (Okubo y Aida 2003; Parhar 2003; Kah et al. 2007). Igualmente se ha reportado que la GnRH está involucrada en el control de la hormona de crecimiento, la prolactina, la somatolactina y la hormona estimuladora de la tiroides (Somoza et al. 2002). Es en la región anterior del cerebro, en el cerebro medio y en el área pre-óptica donde se sintetiza la GnRH (Norris 1980; Kah et al. 2007).

Las GnRHs, producidas en las neuronas que están presentes en las diferentes áreas del cerebro, acceden a la hipófisis de los teleósteos a través de conexiones neuronales directas. Su interacción con receptores específicos, situados en la membrana de los gonadotroforos de la glándula pituitaria y acoplados a diversos sistemas de segundos mensajeros, estimula la síntesis y secreción de glicoproteínas conocidas como gonadotropinas (Peter 1983). Son dos los tipos de gonadotropinas (GtHs) sintetizadas por la hipófisis, la GtH I, involucrada en los eventos de vitelogenénesis y espermatogénesis y la GtH II, involucrada en los eventos de maduración final del ovocito, ovulación y espermiación. Estas hormonas son homologas a la hormona folículo estimulante (FSH) y a la hormona leutinizante (LH) de tetrápodos y mamíferos (Swanson et al. 2003). Bioquímicamente estas GtHs contienen una subunidad  $\alpha$  común, unidas a una subunidad  $\beta$  específica y presentan diferentes funciones y patrones de expresión en relación a los diferentes estadios de maduración dentro del ciclo reproductivo (Hellqvist et al. 2006). Una vez sintetizadas, son liberadas al torrente sanguíneo, y dirigidas a la gónada donde la GtH I ó FSH estimula la síntesis de testosterona, un potente andrógeno (Schulz y Miura 2002), que al ser aromatizado se convierte en  $17\beta$ -estradiol, un potente estrógeno (González y Piferrer 2003; Piferrer y Blázquez 2005). Todo esto bajo un esquema de retroalimentación (Peter y Yu 1997).

En las hembras, el hígado responde a este estímulo produciendo vitelogenina que es incorporada en los ovocitos vía endocitosis en forma de vitelo (Babin et al. 2007). A este

proceso se le conoce como vitelogénesis o primera etapa de maduración (Ng e Idler 1983; Dawson 1998; Tyler y Sumpter 1996). En lo machos, en esta primer etapa se lleva a cabo la espermatogénesis que culmina con la producción de espermatozoides flagelados o espermiogénesis (Mylonas y Zohar 2001). La segunda parte del proceso o maduración final de la gónada, los gametos (ovocitos y espermatozoides) han alcanzado un tamaño apreciable, se incrementa los niveles de GtH II ó LH y disminuye el nivel de GtH I, por lo que se da un cambio en la síntesis de los esteroides producidos por la gónada. Esta producción, cerca de la etapa de ovulación, cambia drásticamente a algún tipo de precursor de la progesterona (inductoras a la maduración [MIS]), principalmente la  $17\alpha$ , 20h-dihydroxy-4-pregnan-3-uno (ver esteroides sexuales abajo), entre otros y en machos, la 11-ketotestosterona. La maduración final culmina con la liberación de los gametos al medio. Este cambio en las hormonas esteroides se llama variación esteroideal y marca un punto de gran importancia en el proceso de maduración (Redding y Patiño 1993; Dawson 1998). En las hembras, la maduración final de ovocito ocurre al finalizar la vitelogénesis. El núcleo o vesícula germinal migra hacia el polo animal o micrópilo, sitio de entrada del espermatozoide. Las gotas lípidicas presentes en el citoplasma, como resultado de la incorporación de vitelogenina, se fusionan (coalescencia), hay rompimiento de la vesícula germinal, una marcada hidratación del ovocito y se reinicia la meiosis poco antes del desove (Goetz 1983; Yaron 1995). En los machos, la etapa final o espermiación ocurre durante la temporada de desove e incluye la adquisición de motilidad del espermatozoide, hidratación de los testículos con plasma seminal y producción considerable de semen (Slater et al. 1994).

#### *1.2.2.1 Esteroides Sexuales*

La gónada de los peces teleósteos produce tres tipos de esteroides que son importantes para la reproducción (Fostier et al. 1983):

- 1) Estrógenos:  $17\text{-}\beta$  estradiol, estrona.
- 2) Andrógenos: Testosterona, 11-Ketotestosterona, androstendiona.

3) Progestinas, progestágenos o esteroides: Pregnenolona,  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona, progesterona,  $17\alpha$ -hidroxiprogestero,  $17\alpha$ - $20\beta$ -dihidroxiprogestero,  $17\alpha$ - $20\beta$ - $21$ -trihidroxiprogestero.

Los esteroides sintetizados en presencia de LH son conocidos como sustancias inductoras a la maduración (MIS), los más comunes son el  $17\alpha,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnan-3-uno ( $17,20\beta$ P ó DHP), el  $17,20\beta,21$ -trihidroxi-4-pregnan-3-uno ( $17,20\beta,21$ -P ó  $20\beta$ -S ó THP), el  $20\beta$ dihydroprogesterona y el 11-deoxicorticosterona (DOC) y son sintetizados y secretados de las células foliculares que rodean al ovocito (Suwa y Yamashita 2007; Nagahama y Yamashita 2008). Después de su producción, los MIS atraviesan la zona radiata, hacen contacto con receptores en la superficie de la membrana del ovocito (Redding y Patiño 1993; Thomas et al. 2002; Thomas 2003) y se da inicio la maduración final, que consiste en la inducción al rompimiento de la vesícula germinal. De estos esteroides, el DHP está considerado como el MIS con mayor eficacia en la inducción en la mayoría de los teleosteos (Voronina y Wessel 2003; Nagahama y Yamashita 2008).

En las hembras, es en las células foliculares que rodean al ovocito donde se lleva a cabo la síntesis de los esteroides sexuales, esto es, durante la vitelogénesis la FSH (LH) estimulan la síntesis de testosterona en las células de la teca y su aromatización a estradiol en la granulosa (Ng e Idler 1983; Dye et al. 1986; Zanuy y Carrillo 1987; Dawson 1998; Nagler e Idler 1990; Hara et al. 1993; Jobling 1995; Takemura y Oka 1998). Al término de la vitelogénesis, la LH estimula poco la síntesis de estradiol, un incremento transitorio en plasma de testosterona durante la migración de la vesícula germinal y una dramática elevación en plasma de los MIS, actúan sobre los ovocitos a nivel de membrana para inducir la maduración final del ovocito (Peter y Yu 1997) en conjunto con las progesteronas como la DHP (Donaldson 1990). Estos cambios esteroidogénicos y el proceso de maduración final pueden durar tan sólo horas, un par de días o más de una semana dependiendo de la especie (Mylonas y Zohar 2001).

En los machos, los principales andrógenos son la testosterona, la  $17\alpha$ -hidroxiprogestero, androsterona y 11-ketotestosterona y juegan un papel preponderante en la espermatogénesis y el comportamiento reproductivo (Miura y Miura 2003). La

actividad androgénica de la 11-ketotestosterona quedó señalada como el principal estimulante en el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios en salmones. La testosterona, androsterona y  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona están catalogadas como las precursoras de la 11-ketotestosterona (Hoar 1969) por lo que los niveles de testosterona y 11-ketotestosterona covarian durante casi todo la temporada reproductiva. Los niveles picos en plasma son durante la espermiogénesis y declinan justo antes o durante el periodo de espermiación. La LH y los MIS inducen el incremento en el volumen de semen mediante la producción de plasma seminal y los MIS estimulan la capacidad motriz de los espermatozoos almacenados (Mylonas y Zohar 2001).

Las hormonas esteroides circulan en sangre ya sea de manera libre, ligados a albumina o a una proteína ligante de esteroides específicos. Los estrógenos y los andrógenos, principalmente estradiol y testosterona se unen a esta proteína, aunque también se unen a progesteronas y corticoides pero en menor afinidad. Los esteroides unidos a la proteína se protegen del metabolismo, esto es, previenen de la degradación del mismo, por lo que esta proteína actúa como un reservorio de hormonas (Hobby et al. 2000).

### ***1.3 Disfunción Reproductiva en teleósteos***

La interrupción parcial o total del proceso reproductivo en teleósteos adultos se conoce como disfunción reproductiva y puede darse a tres niveles: 1) durante la primera etapa de la gametogénesis, 2) durante la maduración final del ovocito, o bien 3) durante la ovulación o desove, siendo las hembras las más susceptibles a ello (Zohar y Mylonas 2001). Esta deficiencia reproductiva no sólo se ha observado en teleósteos silvestres o en cautiverio sino también en otras especies como reptiles, mamíferos y aves. Puede ser el resultado de alteraciones en el ambiente o por la presencia de algún agente que interfiera con la función normal del proceso reproductivo (Takatsuki y Yamaguchi 2001).

#### ***1.3.1 Disfunción Reproductiva en la piscicultura***

La Acuicultura tiene como objetivo primordial la reproducción de especies de mayor interés socio-económico bajo condiciones controladas de cautiverio. Sin embargo, debido a

que generalmente las condiciones de cultivo son totalmente diferentes con respecto a las condiciones en las que se encuentran las poblaciones naturales, en la mayoría de los casos se observan alteraciones en su ciclo reproductivo. Se ha reportado que numerosas especies no se reproducen durante el primer año en cautividad o inclusive otras no llegan a hacerlo nunca, probablemente por alguna alteración endocrina (Matsuyama et al. 1991). Dicha alteración del proceso reproductivo o disfunción reproductiva puede ser el resultado de la combinación del estrés generado por el confinamiento, manipulación, espacio insuficiente y la falta de algún estímulo ambiental apropiado (Mylonas y Zohar 2007).

Existen dos formas de contrarrestar la disfunción reproductiva en cautiverio, ya sea mediante la manipulación de factores ambientales, principalmente fotoperiodo y temperatura o bien mediante el uso de tratamientos hormonales que induzcan la maduración final, la ovulación y finalmente el desove (Mylonas y Zohar 2007). En primer instancia se utilizaron extractos crudos de pituitaria (Houssay 1930), consecutivamente se comenzó a utilizar la hormona hCG extraída de la orina de mujeres embarazadas (Lam 1982), sin embargo, se ha visto que los peces pueden llegar a generar resistencia inmune a dicha glucoproteína (Zohar y Mylonas 2001). Otras hormonas que se han empleado con resultados favorables son la LHRHa (Thomas y Boyd 1988) o la GnRHa (Peter et al. 1988) ya que estos decapeptidos son pequeños y no generan respuesta inmune, además pueden permanecer por más tiempo en el torrente sanguíneo ya que son resistentes a la degradación enzimática de las endonucleasas (Zohar y Mylonas 2001; Mylonas y Zohar 2007). Sin embargo, el uso de GnRHa no siempre resulta en una ovulación satisfactoria ya que se ha observado que en especies con desarrollo asincrónico y desoves múltiples es mínimo el porcentaje de hembras que alcanzan la ovulación y el desove, por ello es que se emplean diversos tratamientos hormonales: GnRHa sola, GnRHa con una dopamina antagonista, GnRHa más LH, etc. y su uso dependerá de la especie (Mylonas y Zohar 2001).

### 1.4 Estrés en teleósteos

El estrés es la respuesta inespecífica del organismo a cualquier demanda (estresor) a la que sea sometido (Selye 1956). Puede considerarse como el momento en el que la homeostasis del organismo se encuentra amenazada o alterada por algún factor externo, donde se activan complejas respuestas fisiológicas y conductuales que ayuden a restablecer dicha homeostasis (Barton 2002; Campbell 2008). Tales respuestas fisiológicas se pueden categorizar en respuestas primaria, secundaria y terciaria (Fig. 4), con cambios que pueden ser a nivel metabólico, hematológico, hidromineral, estructural entre otros (Barton e Iwama 1991).



**Figura 4.** Estresores químicos, físicos y percibidos que actúan sobre el pez provocando posibles cambios fisiológicos, los cuales están agrupados en respuestas primaria, secundaria y terciaria. En algunos casos una respuesta primaria puede provocar directamente una respuesta secundaria y ésta una terciaria. Tomado de Barton 2002.

La respuesta primaria representa la percepción de un estado alterado e inicia una respuesta neuroendocrina/endocrina que forma parte de la respuesta generalizada a estrés. Esta respuesta incluye la rápida síntesis y liberación de hormonas de estrés, catecolaminas y cortisol (hidrocortisona), al torrente sanguíneo. Ambas sintetizadas en el riñón cefálico. Esta liberación de cortisol comienza en el eje *Hipotálamo-Pituitaria-Interrenal (HPI)*, mediante la síntesis de la hormona liberadora de la hormona adrenocorticotropa u hormona liberadora de corticotropina en el hipotálamo, la cual estimula a las células corticotrópicas de la parte anterior de la glándula pituitaria para la síntesis de la hormona adrenocorticotropa, corticotropina o corticotrofina, la cual circula en sangre y se une en forma específica a receptores con alta afinidad en la superficie de células adrenocorticales, dentro del riñón cefálico y así estimular la síntesis y secreción de corticoesteroides (Nandi 1967; Barton 2002; Acerete et al. 2005). Además, este glucocorticoide no solo interviene en la respuesta al estrés, sino también su presencia es esencial para que se puedan llevar a cabo procesos fisiológicos importantes como el metabolismo de carbohidratos, lípidos, proteínas así como en procesos antiinflamatorios y respuestas inmunes. También está relacionado con la adaptación de los peces al agua marina y en procesos de regulación osmótica e iónica (Acerete et al. 2005).

La respuesta secundaria comprende varios efectos bioquímicos y fisiológicos asociados con el estrés, y mediados por las hormonas anteriormente mencionadas. Estas hormonas activan un número de vías metabólicas que resultan en la alteración de la química sanguínea, se observan cambios en los niveles de iones y metabolitos en plasma y tejido, en la composición hematológica, particularmente una leucopenia (disminución de linfocitos) y una granulofilia (aumento de granulocitos) y de las proteínas de choque térmico. Todos estos cambios relacionados con ajustes fisiológicos por ejemplo en el metabolismo, la respiración, el estado ácido-base, el equilibrio hidromineral, la función inmune y las respuestas celulares (Arends et al. 1999; Barton 2002). Además, dado que el estrés es un proceso demandante de energía, el animal moviliza sustratos energéticos para hacer frente al estrés metabólico como el incremento de glucosa en sangre con la finalidad de proveer

energía necesaria a cerebro, branquias y músculos mediante la gluconeogénesis y glucogenolisis (Arends et al. 1999).

La respuesta terciaria representa al animal completo y cambios a nivel poblacional asociados al estrés. Si el pez no es capaz de aclimatarse o adaptarse al estresor, cambios en el animal pueden ocurrir como la repartición de energía mediante la diversificación de la misma para hacer frente a la demanda energética realizada asociada al estrés y afectar procesos tales como la reproducción, el crecimiento o inmunosupresión (Iwama et al. 1998; Arends et al. 1999; Barton 2002).

Toda manipulación excesiva en los reproductores, así como el proceso mismo de extracción de los gametos por medio de presiones abdominales generan un elevado estrés, que se ve reflejado en la disminución de la calidad del desove, fecundidad y fertilidad por un efecto de inmunodepresión (Hobby y Pankhurst 1997). Por tanto, el conocimiento de los mecanismos que regulan la función reproductora de las especies de interés económico es un requisito indispensable para el desarrollo de la Acuicultura. Una vez adquiridos los conocimientos necesarios sobre el proceso reproductor y su regulación en una especie determinada es posible controlar en cierta medida las distintas etapas de la reproducción.

La captura es uno de los pasos obligados en la acuicultura y los animales responden a este estresor mediante una serie de respuestas fisiológicas con el fin de compensar dichos cambios (Abreu et al. 2009). Estudios realizados en varias especies de teleósteos, han demostrado que el estrés causado por la captura y manejo de los peces está asociado con un incremento de cortisol y una disminución de andrógenos y estrógenos en plasma (Clearwater y Pankhurst 1997). Se ha establecido al estrés como uno de los principales factores inhibitorios del proceso reproductivo, afectando de manera considerable los procesos endocrinos que se llevan a cabo durante esta etapa, disminuyendo de esta manera la producción de gametos y larvas. Como primer efecto del estrés sobre el individuo es la elevación del cortisol en sangre. Estudios previos han señalado que este corticoesteroide inhibe el crecimiento gonadal, disminuye los niveles en sangre de GtHs, vitelogenina y esteroides gonadales tanto en salmónidos como en otros teleósteos (Mommsen et al. 1999).

Tanto el cortisol como otros parámetros fisiológicos (lactato, osmolaridad, hematológicos) han demostrado ser excelentes indicadores de estrés en una gran variedad de animales, permitiendo determinar el grado de estrés al que está sometido el pez (Campbell 2008; Abreu et al. 2009). Conjuntamente, han sido utilizados en la determinación del estado de salud de organismos tanto silvestres como cultivados. Dado que las respuestas biológicas al estrés varían considerablemente en tiempo y magnitud entre especies, es importante entender la escala de la respuesta por especie y también de la respuesta concerniente a una línea basal (Campbell 2008), esto es, es necesario conocer dicha línea basal para poder determinar el tipo de respuesta (Abreu et al. 2009). Sin embargo, la falta de una línea basal de cortisol en plasma es uno de los principales problemas al llevar a cabo estudios de estrés en peces, particularmente cuando se realizan comparaciones de respuesta al estrés de diferentes especies. Hasta el momento, el valor de cortisol en plasma de un pez no estresado es  $<10$  ng/mL. Sin embargo, existe variación en las especies relacionadas a factores tales como la edad, estado de maduración sexual, temporada, temperatura del agua y en mayor importancia el método de obtención de plasma así como del método de captura (Clearwater y Pankhursts 1997).

Por tanto, el estrés es una respuesta biológica de adaptación a condiciones adversas y el pez responde mediante la activación de respuestas tales como incremento de cortisol circulante y glucosa así como cambios en el balance iónico y perfil hematológico (Abreu et al. 2009).

### ***1.5 Bioquímica Sanguínea en teleósteos***

El análisis de indicadores bioquímicos sanguíneos en la piscicultura ha mostrado ser una herramienta muy útil en la evaluación y monitoreo del estado de salud tanto de organismos silvestres como cautivos (de Pedro et al. 2005; Asadi et al. 2006) ya que se trata de valores fisiológicos especie-específicos y dependientes de la edad (Anver 2004). Varios factores son los que pueden provocar cambios temporales sobre la bioquímica sanguínea en los peces tales como el ciclo reproductivo (Svoboda et al. 2001), la alimentación, la temperatura, el pH, el fotoperiodo, etc. (Bayir et al. 2007). Los indicadores bioquímicos proveen

información importante sobre desordenes metabólicos, deficiencias y estrés crónico antes de que estos presenten alguna señal clínica (Bahmani et al. 2001), por lo que es importante conocer cómo es que los parámetros bioquímicos pueden cambiar conforme al tiempo (Terasawa et al. 2002). Factores exógenos tales como manipulación de los ejemplares, enfermedades, y estrés provocan cambios significativos en la composición sanguínea. Fluctuaciones en la concentración de cortisol, glucosa y colesterol ha sido detectadas debido a la manipulación (Zhou et al. 2009) y al estrés por hipoxia (Silkin y Silkina 2005). Los niveles de cortisol y glucosa están considerados como indicadores específicos de estrés (Svoboda et al. 2001).

### ***1.6 Sistema Inmunológico en Teleósteos***

El sistema inmunológico de los peces teleósteos constituye un mecanismo de defensa altamente complejo. Dada esa complejidad, se divide en dos tipos: respuesta innata o inespecífica y respuesta adaptativa o específica (Bernstein et al. 1998; Olabuenaga 2000; Tort et al. 2003; Magnadóttir 2006). Ambas respuestas se dividen a su vez en humoral y celular. La primera dependen de la acción de sustancias solubles halladas en los distintos fluidos corporales, y la segunda dependen de la acción directa de las células de defensa, los leucocitos (Bowden 2008).

De manera general el sistema inmune de cualquier organismo lleva a cabo tres funciones o tareas básicas (Lomonte 2003):

- 1) Defensa inmunológica: Es la función de reconocimiento y eliminación de los agentes infecciosos o sus productos. Se incluye también la respuesta dada por otros agentes exógenos no infecciosos.
- 2) Homeostasia: Se refiere al mantenimiento del equilibrio interno. El sistema inmune reconoce y elimina células y moléculas propias que han envejecido o deteriorado por causas diversas. Se incluye función reguladora en la hemopoiesis, reparación y regeneración de tejido dañado, balance hormonal, entre otros.
- 3) Vigilancia: Es la función de reconocer y atacar aquellas células que han sufrido mutaciones.

La función adecuada de ambos sistemas de defensa, innato y adquirido, está íntimamente relacionada con factores como estatus nutricional, fisiología del pez así como de factores externos (fotoperiodo, temperatura, etc.). Cambios ambientales pueden afectar de manera aguda o crónica el sistema inmune de los peces, dependiendo del tiempo de exposición. Un impacto agudo involucra una respuesta del sistema inmune innato mientras que un impacto crónico una respuesta del sistema inmune adaptativo. Por ejemplo, impactos de corta duración puede provocar estrés en el animal y este puede ser medido por el incremento en los niveles de cortisol que ha demostrado ser un inmunosupresor y anti-inflamatorio (Mommsen et al. 1999; Rotllant et al. 2000). Bajo circunstancias normales, la liberación de cortisol está asociada con estrés, gluconeogénesis, función metabólica, inmunosupresión y osmoregulación. Por tanto, elevados niveles de estos glucocorticoides han demostrado ser inhibidores de los factores humorales relacionados con la respuesta inflamatoria (Fast et al. 2008), con la actividad fagocitaria, disminución de la actividad de los anticuerpos (Harris y Bird 2000), de la explosión respiratoria en leucocitos (Esteban et al. 2004). Diversos estudios han demostrado que el estrés o administración de cortisol disminuye la resistencia de los peces a patógenos bacteriano o micóticos (Harris y Bird 2000). Sin embargo, ésta respuesta puede disminuir conforme al tiempo a pesar de mantenerse los cambios en el ambiente (Bowden 2008). Actualmente, varias especies de teleósteos están siendo utilizadas para la comprensión de ciertas funciones básicas de algunos componentes del sistema inmune. Cada vez más se considera al sistema inmune como una red compleja y sofisticada con una respuesta multinivel (Whyte 2007).

### ***1.7 Hematología en Teleósteos***

La hematología es una ciencia que se encarga del estudio de la sangre y de los elementos que la conforman así como de los trastornos estructurales y bioquímicos de estos elementos que puedan conducir a una enfermedad (Jaramillo-Schadebrodt 2005). Dado su enfoque etiológico, de diagnóstico, de tratamiento, de pronóstico y de prevención de las enfermedades de la sangre y órganos hemo-linfo-productores, la hematología es una herramienta muy asistida tanto en medicina como en veterinaria. Un estudio hematológico o biometría hemática puede incluir determinaciones cuantitativas como: valor de

hematocrito, concentración de hemoglobina, recuento de glóbulos rojos, recuento diferencial de glóbulos blancos y plaquetas y velocidad de sedimentación, entre otros (Carrillo-Farga 2000). Su aplicación no requiere de equipos caros ni sofisticados y permite anticiparse a las manifestaciones clínicas de las enfermedades mediante el monitoreo de los estados fisiológicos, nutricionales y sanitarios de los organismo (Bahmani et al. 2001).

El estudio sobre parámetros hematológicos en peces se ha venido desarrollando desde hace aproximadamente 70 años (Katz 1951; Hesser 1960; Blaxhall y Diasley 1973). Desde entonces, se ha generado información al respecto, sin embargo, ha sido en estos últimos 15 años que se ha extendido grandemente los conocimientos hematológicos (Soldatov 2005), principalmente para especies de interés de cultivo (Valenzuela et al. 1999; Zeixa et al. 2007). Con ésta herramienta diagnóstica se obtienen resultados en corto tiempo que permiten evaluar cualquier perturbación fisiológica que pueda afectar la salud de los organismos (Davidov et al. 2002). Sin embargo, para una interpretación correcta de los resultados es necesario tomar en cuenta una gran variedad de factores como edad, estrés, estado nutricional, calidad del agua así como el hábitat de la especie ya que por ser animales poiquiloterms están bajo la influencia del ambiente en el que viven (Bastardo y Diaz-Barberan 2005).

La aplicación de la biometría hemática en la piscicultura ha permitido comprobar experimentalmente que variaciones en la temperatura, salinidad y oxígeno del agua pueden provocar cambios fisiológicos en los niveles de algunos parámetros sanguíneos (Valenzuela et al. 2007). Además, se ha relacionado esta alteración con épocas de maduración gonadal y sexo (Sarasquete 1984; Collazos et al. 1998), crecimiento (Harding y Hoglund 1983), estrés (Pierson et al. 2004) y cuadros patológicos (Silveira et al. 1996). Sin embargo, se ha aplicado poco en peces marinos (Valenzuela et al. 1999). Específicamente en el conteo de leucocitos, los resultados aún son polémicos en distintas especies. Por ejemplo en salmónidos, en la especie de salmón *Oncorhynchus nerka* (Alcorn et al. 2002) y en la trucha arcoíris *O. mykiss* (Hou et al. 1999), la inmunodepresión durante la reproducción se ve manifestada por una disminución de leucocitos (leucopenia) en sangre. En contraste, en machos de la carpa *Leuciscus cephalus* (Rohlenová y Šimková 2010) y el lenguado de

invierno *Pseudopleuronectes americanus* (Bridges et al. 1976), ocurre una respuesta inmune, en donde un incremento de leucocitos (leucofilia) es evidente. Cabe señalar que después de haber realizado una revisión de la literatura, el trabajo de Bridges et al. (1976), es el único que reporta un perfil anual de leucocitos que corresponde a un pez marino. Bridges y colaboradores argumentan que el incremento en leucocitos durante la temporada reproductiva del lenguado de invierno se podría explicar por un aumento de estrés y de una mayor susceptibilidad a infecciones; patrones que están tipificados solamente en salmónidos y que en la actualidad no se pueden generalizar a todas las especies de peces.

### *1.7.1. Sangre de Teleósteos*

La sangre es un tejido líquido de color rojo que circula por venas, arterias y capilares de todos los vertebrados y tiene como función principal proveer de oxígeno y nutrientes a cada uno de los órganos y tejidos que conforman a un individuo. Además, conduce los productos de la actividad metabólica (ejemplo, CO<sub>2</sub>), transporta mensajeros químicos (hormonas) y defiende el cuerpo de infecciones gracias a la presencia de células especializadas para ello. Está compuesta por los elementos formes o figurados (células sanguíneas) que conforman el 45% del total de la sangre, suspendidos en el plasma sanguíneo que conforma el 55% (Leeson et al. 1990). En su conjunto ocupan un volumen de entre el 5 y el 8% del peso corporal de la mayoría de los vertebrados, mientras que en los peces es del 2 al 4% (Jaramillo-Schadebrodt 2005).

### *1.7.2 Plasma sanguíneo*

El plasma de los peces es un líquido claro con características similares a la de mamíferos; compuesto en un 90% de agua y el resto de compuestos orgánicos e inorgánicos disueltos, como por ejemplo elementos formes, productos absorbidos durante la digestión, sales, desechos metabólicos, hormonas, enzimas, anticuerpos y gases disueltos. La única diferencia en comparación con el plasma de los vertebrados superiores está en el contenido proteínico, ya que es menor (Satchell 1991). Sus principales componentes son albumina, lipoproteínas, globulinas, ceruloplasmina, fibrinógeno y iodurofornio (único en peces)

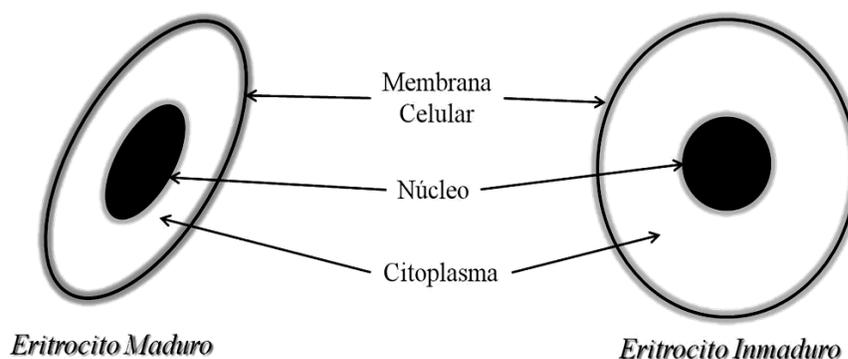
(Lagler et al. 1990) y su presencia y abundancia en sangre dependerá de la especie así como de su función metabólica (Satchell 1991).

### *1.7.3 Elementos Formes o Figurados*

Como todo tejido, la sangre está conformada por células especializadas que en su conjunto se conocen como elementos formes o figurados que varían en forma, tamaño y función. Estos componentes celulares son los eritrocitos o glóbulos rojos, encargados del transporte de oxígeno; los trombocitos con actividad coagulante y los leucocitos o glóbulos blancos encargados de la respuesta inmune. Su morfología, presencia y/o ausencia dependerá de la especie (Jaramillo-Schadebrodt 2005). Además, el estudio de estos elementos formes es de gran importancia clínica, dado que la morfología, número y porcentajes de los diferentes tipos celulares son indicadores de muchos cambios patológicos en el cuerpo de un organismo (Leeson et al. 1990).

#### *1.7.3.1 Eritrocitos*

Los glóbulos rojos o eritrocitos son las células más abundantes dentro del tejido sanguíneo tanto en peces como en el resto de los vertebrados. Su función principal es la de transportar oxígeno de las branquias a los tejidos con ayuda de la hemoglobina (Hb) y en menor grado del transporte de CO<sub>2</sub> (Satchell 1991). Se ha observado que el contenido de Hb en sangre de peces varía de acuerdo al número de eritrocitos presentes, con valores que van del 37 al 79% en algunos teleósteos marinos (Lagler et al. 1990). La cantidad y tamaño de los eritrocitos varía según la especie (Satchell 1991; Collazos et al. 1998; Jaramillo-Schadebrodt 2005; Valenzuela et al. 2007; Najiah et al. 2008). Sin embargo, varios investigadores coinciden en que los teleósteos presentan una concentración promedio de 1.0 a 3.0 x 10<sup>6</sup> células/mm<sup>3</sup> en la sangre y su tamaño varía entre 10 a 15 µm en su eje mayor y entre 8 y 10 µm en su eje menor (Jaramillo-Schadebrodt 2005).



**Figura 5.** Esquema representativo de un eritrocito maduro y un eritrocito inmaduro de teleostes.

Tomado de [http://www.aqualex.org/elearning/fish\\_haematology/english/index.html](http://www.aqualex.org/elearning/fish_haematology/english/index.html)

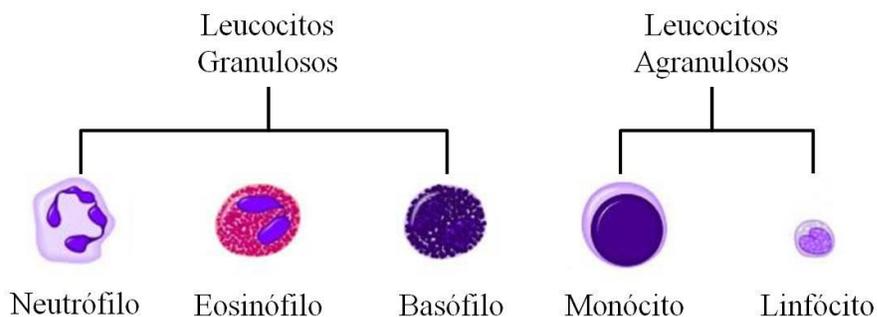
Morfológicamente, los eritrocitos maduros (EM) son de forma elíptica con un núcleo ovoide central (Fig. 5) de cromatina condensada, constituida por heterocromatina de coloración púrpura oscuro. Presentan un citoplasma abundante, granular sin inclusiones ni mitocondrias y levemente eosinófilo de coloración azul-grisácea. La superficie de la célula es lisa (Jaramillo-Schadebrodt 2005; Zeixa et al. 2007). Los eritrocitos inmaduros (EI) se caracterizan por ser de forma redonda, con un núcleo central esférico o casi esférico (Fig. 5). Pueden ser de tamaño más grande o más pequeños que los EM (Zeixa et al. 2007). Contienen cromatina, de aspecto reticular, en menor grado comparado con los EM, el citoplasma presenta una coloración azul-violácea más oscura que el de los EM (Fijan 2002). Se les llama reticulocitos si son teñidos con azul brillante de crecilo. Si son teñidos con May Grünwald-Giemsa se les da el nombre de policromatófilos y su nombre se refiere a la ambigüedad tintorial del citoplasma; rosado-naranja por la afinidad de la hemoglobina por la eosina y azul (basofila) que indica activa síntesis proteínica (Valenzuela et al. 1999; 2007).

Evaluar las características morfológicas y contenido de eritrocitos en sangre ha demostrado ser muy útil en la determinación de anomalías hematológicas en la piscicultura. Se evalúan en función de índices primarios o derivados. Los índices primarios corresponden al contenido de Hb, recuento eritrocitario (RE) y hematocrito (Ht). Estos valores indican la capacidad de transporte de  $O_2$  en la sangre y la habilidad de un organismo para encontrar los requerimientos de  $O_2$  metabólico (Jaramillo-Schadebrodt 2005).

Existe poca información en relación a los policromatocitos y se han empleado principalmente en el estudio de anemias regenerativas o al control del tratamiento de anemias carenciales. Sin embargo, un estudio realizado en salmónidos, relacionando cantidad de EI con el estrés, abrió la posibilidad de utilizar a estas células como otro indicador de anormalidad (Valenzuela et al. 1999). En sangre, se observa un mayor contenido de EM que EI en una proporción directa al estado de madurez. Se ha calculado que la presencia de los EI en sangre va del 1 al 10%, por lo que modificaciones en dicho porcentaje es un indicador de alteración en la actividad eritropoietica (Fijan 2002).

### 1.7.3.2 Leucocitos

Los glóbulos blancos o leucocitos son un conjunto heterogéneo de células sanguíneas que son los efectores celulares de la respuesta inmunitaria. Estos pueden encontrarse en sangre circulante o en tejido y pueden formar complejos celulares llamados centros melanomacrofágicos. Su identificación y clasificación se lleva a cabo mediante criterios morfológicos, sin embargo, debido al uso de diferentes técnicas de tinción y la falta de una nomenclatura uniforme (Sarasquete 1984) puede existir problemas al momento de clasificarlos, corriendo el riesgo de generar diagnósticos erróneos. Aunado a esto, se pueden observar, en la sangre circundante de los peces, leucocitos en diferentes estadios de madurez lo que provoca confusión, dificultando aún más su clasificación (Zexia et al. 2007).



**Figura 6.** Esquema de los diferentes tipos de leucocitos o glóbulos blancos presentes en teleosteos.  
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003440.htm>

De manera general los leucocitos se dividen en dos grupos principales (Fig. 6): leucocitos granulados (Neutrófilos, Eosinófilos y Basófilos) y leucocitos agranulosos (Monocitos o Macrófagos y Linfocitos) (Fernández et al. 2002; Jaramillo-Schadebrodt 2005); la presencia y abundancia dependerá de la especie así como de factores como estatus fisiológico del animal y condiciones ambientales. Se han establecido cifras que van de los 2,000 hasta 150,000 leucocitos/mm<sup>3</sup> en los diferentes grupos de peces (Lagler et al. 1990; Fernández et al. 2002). Los glóbulos blancos pueden llegar a constituir el 10% del total de la población células sanguínea, siendo los linfocitos los más abundantes (Jaramillo-Schadebrodt 2005). La evaluación de estas células (leucogramas), al igual que eritrocitos, permite determinar el estado de salud de los peces (Peutz et al. 1996).

#### *1.7.3.2.1 Linfocitos*

Son agranulocitos altamente diferenciados y pertenecen al sistema inmune de todos los vertebrados. Morfológicamente, son células de tamaño pequeños, oscila entre 4.5 y 8  $\mu\text{m}$ , son células no fagocíticas y constituyen el 50-90% del total de los leucocitos (Olabuenaga 2000). Su número en sangre varía y dependen de muchos factores, como la especie, las condiciones de extracción de la sangre, condiciones fisiológicas del pez o incluso de las variaciones individuales que habitualmente se presentan. El citoplasma es escaso, frecuentemente irregular debido a la proyección de los seudópodos, es basófilo y contiene al núcleo grande, redondo o levemente reniforme, con la cromatina muy agrupada, que ocupa gran parte del citoplasma (Fig. 6). Bajo el microscopio, el citoplasma se dispone como un fino anillo basófilo alrededor del núcleo y en él se encuentran mitocondrias, retículo endoplásmico liso y rugoso, ribosomas y aparato de Golgi, lo que demuestra que son células de alto potencial metabólico (Fernández et al. 2002). Por ser células pertenecientes al sistema inmune son producidas en los principales órganos linfoides: bazo, riñón o pronefros y timo (Olabuenaga 2000).

A nivel funcional, son los responsables de la respuesta inmune específica humoral y celular, que se traduce en la producción de anticuerpos, la capacidad citolítica, el proceso

de memoria inmunológica y la liberación de factores reguladores de la función inmune, como las linfocinas (Fernández et al. 2002).

#### *1.7.3.2.2 Monocitos/Macrófagos*

Son los leucocitos móviles de mayor tamaño que varían de 5-10  $\mu\text{m}$  de ancho por 14-16  $\mu\text{m}$  de largo, dependiendo la especie. Morfológicamente, son redondos y ocasionalmente puede observarse pseudopodia. Presentan un núcleo que ocupa entre un medio y un tercio del volumen y puede exhibir una ligera invaginación o forma de riñón (fig.6); la cromatina aparece dispersa (Olabuenaga 2000; Fernández et al. 2002). El citoplasma es denso, con formaciones membranosas y gran número de cuerpos heterogéneos (fagosomas), en ocasiones presenta gránulos de melanina (Peleteiro y Richards 1990). Al teñirse con Giemsa, el citoplasma da una coloración azul-gris o azul brillante. Se tiñen positivamente por reacción al PAS y presentan actividad esterasa inespecífica y fosfatasa ácida concentrada en los gránulos. Se producen principalmente en el riñón (Whyte 2007) y se distribuyen por todos los tejidos y cavidades corporales, pero principalmente se localizan en riñón y bazo y en tejidos inflamados. En teleósteos los macrófagos son especialmente abundantes en el bazo y en el tejido linfomieloideo renal y puede haber en otros tejidos, por ejemplo la mucosa olfatoria y en tejidos inflamados (Olabuenaga 2000). Su presencia en sangre es muy escasa, alrededor del 0.1% aunque en el bagre representan un 1-8% del total de leucocitos (Fernández et al. 2002).

Funcionalmente, son células con capacidad de ingerir y digerir material extraño, inerte o antigénico, así como restos celulares resultantes de la respuesta inflamatoria u otros procesos degenerativos. Además, presentan actividad microbicida tanto intra como extracelularmente durante el proceso de explosión respiratoria. Los macrófagos que contiene el material fagocitado se reúnen en zonas linfoides (principalmente bazo) donde forman los centros melanomacrofágicos y se lleva a cabo la eliminación de los agentes extraños. Estos centros están compuestos por células fagocíticas que contienen material foráneo y grandes cantidades de productos de desecho celular. Por otro lado, los monocitos participan en la respuesta inmune específica como importantes células accesorias en la

iniciación y en la regulación de la inmunidad. Esto es, reconocen y procesan el antígeno bajo la forma de complejos antígeno-anticuerpo y secretan factores solubles que regulan la actividad linfocitaria. Por lo que juegan un papel importante en lo que se conoce como memoria inmune (Olabuena 2000; Fernández et al. 2002).

#### *1.7.3.2.3 Granulocitos*

Son células sanguíneas que se caracterizan por presentar gránulos en su citoplasma. En peces, al igual que en otros vertebrados, morfológicamente se dividen en neutrófilos, basófilos y eosinófilos (acidófilos) (Fig. 6) de acuerdo a sus propiedades tintoriales con tinción de Romanovsky (Hine 1992).

La frecuencia con la se pueden encontrar en sangre así como de su función varía entre y dentro de las especies (Hine 1992; Ainsworth 1992). Constituyen del 4 al 60% del total de leucocitos presentes en sangre. Un aspecto importante de señalar es que varios autores coinciden con la introducción del término heterófilo para la identificación de los granulocitos con formas redondeadas y núcleos multilobulados lo que ha facilitado enormemente su identificación y clasificación (Jaramillo-Schadebrodt 2005). Los granulocitos provienen de las células embrionarias llamadas granuloblastos contenidos en el riñón cefálico.

Los granulocitos están involucrados en la respuesta celular no específica, esto es, responden ante la presencia de material extraño dentro del cuerpo pero no hay un reconocimiento específico del antígeno. Estas células migran hacia donde la invasión ocurre y destruyen esas partículas extrañas mediante fagocitosis o por destrucción directa conocida como respuesta citotóxica. A este proceso se le llama respuesta inflamatoria. La actividad microbicida de los granulocitos está mediada por el proceso denominado explosión respiratoria, que consiste en la capacidad de convertir el oxígeno molecular en una serie de compuestos o metabolitos de oxígeno, entre ellos el anión superóxido ( $O_2^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que son potentes microbicidas capaces de dañar moléculas orgánicas. Es la enzima NADPH oxidasa (nicotinamida-adenin-dinucléotido-fosfato-hidrógeno oxidasa) encargada de reducir el  $O_2$  en anión superóxido y la mayoría de este se

transforma en  $H_2O_2$  espontáneamente o por la enzima superóxido dismutasa (Fernández et al. 2002).

#### *1.7.3.2.3.1 Neutrófilos*

Se les denomina neutrófilos por carecer de afinidad a tintes ácidos o básicos. También se les conoce como heterófilo, plomorfonucleares, leucocitos tipo I o simplemente granulocitos. Morfológicamente presentan un núcleo no central multilobulado, con la cromatina densa y agrupada. El citoplasma contiene gránulos de forma ovalada o redonda que varían en tamaño, presentan mitocondrias y retículo endoplasmático. Al teñirse con Giemsa, el núcleo presenta una coloración púrpura oscuro y los gránulos varían del gris al rosa pálido. El tamaño de los neutrófilos es mayor que el de los linfocitos y eritrocitos, va de 10 a 15  $\mu m$  y presenta una relación núcleo-citoplasma de 1:3 o 1:2 (Fernández et al. 2002; Jaramillo-Schadebrodt 2005).

Los neutrófilos se localizan en sangre circulante y tejidos inflamados y conforma entre 6 y 8% de leucocitos totales, aunque se ha visto que pueden llegar a ser hasta el 25% del total. Son las primeras células en salir del bazo y se forman en el pronefros. Su principal función es la fagocitosis y la actividad microbicida mediada por el proceso de explosión respiratoria. Su importancia radica en su contenido de lisosomas; vacuolas que contienen enzimas y actúan destruyendo los organismo fagocitados por la célula (Jaramillo-Schadebrodt 2005). Otra función es la mediación de la respuesta inflamatoria aguda. A partir del pronefros, estos heterófilos pasan al torrente sanguíneo y migran hacia los tejidos inflamados en respuesta a estímulos quimiocinéticos, aunque éste fenómeno se produce de manera más lenta que en mamíferos. Esto provoca una disminución de los neutrófilos en el pronefros (Hine 1992).

#### *1.7.3.2.3.2 Basófilos*

Son leucocitos con un tamaño aproximado de 8  $\mu m$  de diámetro, un citoplasma que presenta afinidad por los tintes básicos con gran número de gránulos en su interior lo que generalmente ocasiona que no pueda ser distinguible el núcleo (Fig.6). Son células muy

escasas y poco frecuentes en la sangre de los teleósteos ya que constituyen no más del 0.1% del total de leucocitos (Hine 1992). Poco se sabe de la función de éstas células leucocitarias en peces y hasta el momento no se les ha implicado en ningún mecanismo de defensa. Tampoco se sabe el porqué de esta baja ocurrencia o ausencia total de basófilos en sangre de los peces, algunos autores lo atribuyen al uso inadecuado de métodos de tinción, ya que usualmente se utilizan los métodos empleados para mamíferos. En vertebrados inferiores, se ha observado que los gránulos de las basófilos se tiñen pobremente en tinturas disueltas en etanol como el colorante de Wright's. En un estudio realizado con *Sparus aurata* no se observó presencia de basófilos en sangre usando colorante Giemsa o azul de toluidina, sin embargo, se confirmó su presencia al usar microscopia electrónica (Tavares-Dias 2006).

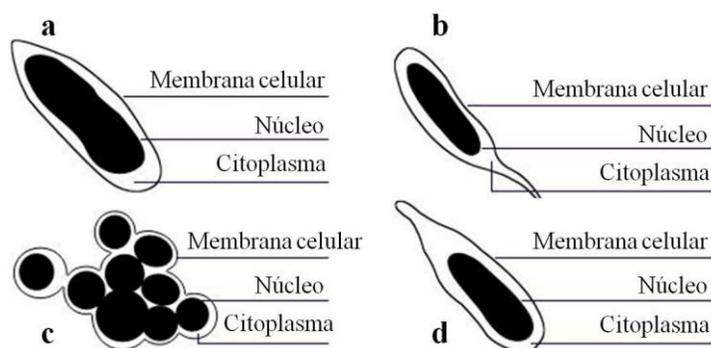
#### 1.7.3.2.3.3 Eosinófilos

Se trata de células leucocíticas de forma redondeada con un núcleo a menudo bilobulado excéntrico, de cromatina laxa, nucléolos aparentes. Un citoplasma azul pálido con gránulos de forma esférica, en bastón recto o curvo y se tiñen con colorantes ácidos en medios alcalinos, como la eosina (Fig.6). El tamaño de la célula varía de acuerdo con la cantidad y tamaño de los gránulos eosinófilos acumulados en el citoplasma y varía entre 4.5 y 15  $\mu\text{m}$  de diámetro y corresponden el 2-3% del total de leucocitos (Fernández et al. 2002; Jaramillo- Schadebrodt 2005).

En la mayoría de los teleósteos los eosinófilos son escasos o ausentes en la sangre circulante (Olabuenaga 2000). Se han observado principalmente en branquias, piel, corazón, vejiga natatoria, tejido hematopoyético y epitelio nasal así como en tejido conectivo, especialmente en el tracto gastrointestinal (Fernández et al. 2002). En algunas especies es abundante en el intestino, lo cual indicaría alguna función en la inmunidad contra bacterias (Olabuenaga 2000). Sin embargo, su función no está clara, pero se cree que intervienen en los procesos de inflamación y defensa celular mediante degradación por lo que se han comparado con los mastocitos o células cebadas de mamíferos (Fernández et al. 2002).

#### 1.7.3.2.4 Trombocitos

Los trombocitos son células sanguíneas que pueden presentar formas que van de redondas a elipsoides (Fig. 7) y se cree están relacionados con el estadio de madurez de la célula, redondo-maduros, elipsoides-inmaduros (Conroy y Armas 1984). El núcleo es globoso, de color violeta y cromatina en forma de heterocromatina. En la mayoría de ellos, el citoplasma es escaso y no es posible su observación. Cuando es visible, el citoplasma es hialino, con discreta basófilia en la periferia y mayor volumen en los polos de las células. Esta ausencia de citoplasma se cree es debido al estrés al que es sometido el pez al momento de su captura, eliminando así el trombocito todo su citoplasma, lo que puede provocar confusión al momento de su clasificación ya que se puede llegar a confundir con los linfocitos (Veiga et al 2000).



**Figura 7.** Esquema de cuatro morfologías principales de trombocitos en teleosteos. Tomado de [http://www.aqualex.org/elearning/fish\\_haematology/english/index.html](http://www.aqualex.org/elearning/fish_haematology/english/index.html)

La principal función de los trombocitos es la coagulación de la sangre, segregan tromboplastina, una enzima que polimeriza el fibrinógeno. También se especula una función tipo fagocitosis pero parcial ya que las partículas no son engullidas en su totalidad por la célula. Su origen aún no ha sido establecido, pero se sugiere al bazo como el tejido generador de trombocitos dado que se han observado en gran cantidad dentro de este tejido (Fernández et al. 2002; Jaramillo-Schadebrodt 2005).

### ***1.8 Avances en acuicultura de la cabrilla sardinera***

La cabrilla sardinera se asignó como especie estratégica del Programa de Acuicultura del CIBNOR en el 2001. Mediante la captura de cabrillas maduras silvestres, así como una proporción de hembras que han madurado en cautiverio, se ha logrado la inducción a la maduración final con el uso de hormonas de hCG y LHRHa, obteniendo fecundidades promedio de 200,000 de huevos y con una tasa de fertilización de alrededor de 62% (Kiewek-Martínez 2004; Gracia-López et al. 2005). De las larvas obtenidas por inducción hormonal, se han llevado a cabo estudios del desarrollo embrionario y morfología de huevos y larvas (Martínez-Lagos y Gracia-López 2009; Gracia López et al. 2004 a,b).

Se desconoce hasta ahora si esta especie tiene una tasa de crecimiento adecuada en estanques de cultivo. Sin embargo, los serranidos presentan, en general, una alta vulnerabilidad a la pesca, como es el caso de la cabrilla sardinera, ya que son especies de crecimiento lento y alta longevidad de 20 a 40 años (Pears 2005). Específicamente para la cabrilla sardinera, el lento crecimiento y la alta vulnerabilidad ya han sido confirmadas por Díaz-Uribe (2001), a través del análisis de otolitos.

Otra característica de la especie es el hermafroditismo, clasificada como protogínica, en donde los individuos son hembras y posteriormente se revierten a machos, patrón sexual predominante entre los Ephinephelidae gregarios. Lo anterior confirmado por Kiewek Martínez (2009) en ejemplares mantenidos en cautiverio, en donde las hembras que fueron capturadas en febrero, se encontraron en estado bisexual en marzo y revertidos a machos en abril. Sin embargo, también se postula que pueda tratarse de una especie gonocórica (Erisman et al. 2008). Recientemente, se ha encontrado que también machos maduros con esperma fluyente se han revertido parcialmente o totalmente en hembras en cautiverio (Dra. D. Guerrero-Tortolero, *comm pers.*). Por ende, la reversión sexual de ésta especie en cautiverio ha representado problemas de sincronización reproductiva, en el sentido de que cuando una proporción de hembras madura, pudieran algunas hembras estar en el proceso de revertirse a machos, o bien no existir machos fluyentes con esperma disponible, o bien, que los machos que estaban disponibles para madurar, estuvieran en el proceso de revertirse

a hembras. Estos aspectos de hermafroditismo relacionados con la maduración de cabrillas, son posiblemente una causa de tipo social, ya que estos grupos tienden a formar “harems” lo que resulta en una escasa maduración en cautiverio que no ha hecho posible el control de la reproducción con fines de acuicultura.

Por otra parte, la cabrilla sardinera ha presentado una alta mortalidad de ejemplares en cautiverio, debido al parecer a una elevada susceptibilidad de enfermedades, cuya pérdida de reproductores se ha tenido que compensar continuamente con la captura de ejemplares silvestres. Investigaciones en Asia en especies similares indican la necrosis viral ocasionada por nodavirus (Lai et al. 2001) e iridovirus (Mao et al. 2008) que son mortales para varias especies cultivadas de meros de la familia Epinephelidae. Sin embargo, aún no se cuenta con este diagnóstico para la cabrilla sardinera. Por otro lado, las infecciones de bacterias, hongos y parásitos, también causan enfermedades agudas en meros cultivados y adicionalmente, factores no infecciosos, como una nutrición no balanceada y factores ambientales y biológicos de los serránidos, pueden llegar a enfermar a los peces (Nagasawa y Cruz-Lacierda 2004).

La falta del control reproductivo y la alta mortalidad ha provocado que la producción de huevos y larvas dependa en su totalidad de la captura de cabrillas maduras silvestres, y además limitada a la temporada reproductiva de marzo a mayo de cada año. Aspectos que no fueron favorables para que continuara como especie estratégica a partir del año 2009 en el Programa de Acuicultura del CIBNOR.

### ***1.9 Justificación***

En todas las especies de peces en donde es necesaria la inducción a la maduración final a través del uso de hormonas, la dosis hormonal se establece generalmente en forma empírica a manera de “ensayo y error”, en donde aquella concentración de una determinada hormona, que mayormente estimula la vitelogénesis y la incorporación del vitelo al ovocito, da como resultado el máximo aumento en el tamaño del huevo y por ende, ovocitos maduros y ovulados para ser fertilizados (Lutz 2001). La cabrilla sardinera es una de estas especies en donde después de hacer un estudio con dos hormonas en la maduración final, se concluyó que tanto la hCG así como la LHRHa, son útiles para inducir a la maduración final, más sin embargo, la hCG mostró significativamente una mayor cantidad de huevos viables y fertilizados (Kiewek-Martínez y Gracia-López 2010). Sin embargo, no siempre se obtiene una respuesta de ovulación favorable y existen diferencias entre los peces que se inducen, por ejemplo, bajo un mismo tratamiento, el ovocito pudiera incrementar su tamaño pero su viabilidad es baja después de realizar la fertilización, o bien, el huevo no llega a su máxima hidratación. Esto crea la necesidad de que se implemente una metodología que cuantifique una respuesta inicial de maduración final de los ovocitos y que sea predecible en un tiempo determinado de que el pez ovulará favorablemente para proceder a la fertilización. Para ello es necesario utilizar marcadores que expliquen este proceso.

Existen pocos estudios en peces que han analizado los cambios en los perfiles sexuales esteroideos durante un tratamiento de inducción hormonal, en los cuales se ha observado que tanto el estradiol, así como la testosterona, son indicadores de una respuesta fisiológica prácticamente inmediata de los ovocitos ante dicho tratamiento y el resultado es una ovulación exitosa. Adicionalmente, el evaluar ambas hormonas permite evaluar de una manera cuantitativa los incrementos de las mismas en relación con el incremento en tamaño del ovocito para su posterior ovulación.

Es por ello, que el presente trabajo se enfocó inicialmente en obtener perfiles de estradiol, testosterona y 11-ketotestostona, en reproductores capturados de cabrilla sardinera durante su periodo reproductivo natural, e inducidos a la maduración final

mediante tres tipos de hormonas, GnRH $\alpha$ , LHRH $\alpha$  y hCG. El fundamento de esta investigación se basó en la respuesta de cada una de estas hormonas a estimular la producción de testosterona y su conversión, vía aromatización, a estradiol por el ovocito y la subsecuente retroalimentación de producción de vitelogenina por el hígado, aumentando el diámetro del mismo. De esta manera, se permitirá conocer en la cabrilla sardinera y de manera individual por cada hembra y también colectivamente, si uno o más de estos esteroides se pueden utilizar como indicadores que puedan predecir el estímulo de un tratamiento hormonal favorable en la maduración final de esta especie.

En segundo término, durante el proceso de optimizar un tratamiento hormonal para inducir a la maduración final, se ha propuesto que la repetida manipulación de los reproductores produce estrés y por tanto, disminuye la producción de esteroides sexuales afectando directamente la maduración final con la degeneración y reabsorción de la gónada (Zohar and Mylonas 2001). Sin embargo, no existe un estudio en la literatura de peces que compruebe que hay un aumento de estrés durante un tratamiento hormonal de inducción a la maduración final.

Es por ello que el presente trabajo de investigación también incluyó el perfil de cortisol durante la inducción a la maduración final con las tres hormonas, el cual permitirá dar un indicativo de estrés provocado por una terapia hormonal, debido a una mayor demanda metabólica de madurar los ovocitos en un período corto de tiempo.

En tercer término, tampoco existen trabajos en peces en donde indiquen si algún metabolito bioquímico tiene un perfil significativo que esté relacionado con una maduración final favorable. Por lo tanto, la evaluación de lípidos totales, triglicéridos, colesterol y glucosa durante la inducción a la maduración final, fueron analizados en el presente trabajo de investigación. Dicha información, permitirá conocer si algún metabolito bioquímico se puede utilizar como un indicador que pueda predecir el estímulo de un tratamiento hormonal favorable en la cabrilla sardinera.

Por último, dentro de los índices hematológicos, las células sanguíneas son de vital importancia en el sistema inmune y son un buen indicador del estado de salud en peces (Blaxhall y Daisley 1973). El conteo diferencial de leucocitos puede indicar la presencia de

una enfermedad infecciosa y proveer información de mecanismos de defensa y la patogénesis de las enfermedades (Fijan 2002a, b). La hematología en peces marinos está recibiendo más atención para llevar a cabo diagnósticos de enfermedades y estado de salud bajo condiciones fisiológicas de reproducción, como es el caso de este estudio, y también pueden ser aplicadas a ensayos de nutrición, factores ambientales, densidades, entre otros (Palíková et al. 1999; Pavlidis et al. 2007; Zexia et al. 2007). Con el objeto de incrementar el conocimiento de células sanguíneas en peces marinos e implementar un procedimiento de diagnóstico que identifique la presencia de infecciones o un mal estado de salud en la cabrilla sardinera en cautiverio, en este estudio se describieron inicialmente las células sanguíneas periféricas y posteriormente se obtuvieron perfiles comparativos entre cabrilla sardinera madura e inmadura silvestre y cautiva de ambos géneros.

## 2. HIPÓTESIS

Del presente trabajo de investigación se elaboraron cuatro hipótesis fundamentales:

Partiendo de la premisa de que la hormona liberadora de gonadotropinas GnRH $\alpha$ , la hormona luteinizante LHRH $\alpha$  y la hormona coriónica humana hCG, son hormonas que actúan directamente en el eje *Hipotálamo-Pituitaria-Gónada* en vertebrados y cuya función está relacionada a la maduración de los gametos y que, una vez que la gónada de un pez presenta una vitelogénesis avanzada, cualquiera de estas hormonas, ya sea de forma endocrina directa o indirecta, estimularán al ovocito para que emprenda la etapa de maduración final y la subsecuente ovulación, entonces se planteó la primera hipótesis de trabajo:

- 1) Si se administran exógenamente cada una de estas hormonas en hembras maduras de cabrilla sardinera, entonces se obtendrá como respuesta un estímulo en los ovocitos, reflejado en un aumento significativo de estradiol, testosterona y 11-ketotestosterona.

Partiendo de la premisa de que el estrés (medido a través de cortisol) y la producción de esteroides sexuales están inversamente correlacionados, se esperaría que después de administrar exógenamente cada una de estas hormonas en hembras maduras de cabrilla sardinera, los niveles de cortisol se mantuvieran constantes o inclusive que disminuyeran. Sin embargo, la contraparte de este proceso representa una mayor manipulación del pez y una demanda metabólica alta para madurar los gametos en un período corto de tiempo, ambos procesos vinculados a un aumento de estrés, con lo cual se planteó la segunda hipótesis de trabajo:

- 2) Si se administran exógenamente cada una de estas hormonas en hembras maduras de cabrilla sardinera, entonces se obtendrá como respuesta un incremento significativo de estrés.

Partiendo de la premisa anterior, en donde ocurre una demanda metabólica alta debida a la maduración final de los ovocitos y que este proceso conlleva un costo energético elevado, se planteó la tercera hipótesis de trabajo:

- 3) Si se administran exógenamente cada una de estas hormonas en hembras maduras de cabrilla sardinera, entonces se obtendrá como respuesta un decremento significativo de componentes bioquímicos plasmáticos.

Partiendo de la premisa de que las células sanguíneas son de vital importancia en el sistema inmune y son un buen indicador del estado fisiológico de un pez y de que la maduración de los gametos, durante la etapa reproductiva conlleva a una inmunodepresion, se planteó la cuarta hipótesis de trabajo:

- 4) Si el proceso de maduración durante la temporada reproductiva de la cabrilla sardinera conlleva una inmunodepresión, entonces se obtendrá un menor porcentaje de leucocitos y en forma individual de linfocitos, granulocitos, monocitos y trombocitos en cabrillas maduras (temporada reproductiva en primavera), comparadas con la cabrillas inmaduras (temporada no reproductiva en verano). Adicionalmente, no existirán diferencias significativas entre hembras y machos de cabrillas inmaduras mantenidas en cautiverio en cuanto al porcentaje de leucocitos y a cada uno de sus tipos celulares mencionados.

### **3. OBJETIVO GENERAL**

Cuantificar perfiles esteroideos y bioquímicos durante la inducción a la maduración final gonádica en la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* sujeta a tres tratamientos hormonales, así como comparar el porcentaje de células sanguíneas circulantes en plasma y el conteo diferencial de leucocitos, entre cabrillas maduras e inmaduras silvestres de ambos sexos, y adicionalmente, entre hembras y machos inmaduros en cautiverio.

### **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar en plasma los niveles de  $17\beta$ -estradiol, testosterona y 11-ketotestosterona en hembras maduras de cabrilla sardinera inducidas hormonalmente al desove.
2. Evaluar el tamaño de ovocito a las 36 h de haber culminado los tres tratamientos de inducción.
3. Evaluar en plasma los niveles de cortisol como indicadores de estrés en hembras maduras inducidas hormonalmente al desove.
4. Evaluar en plasma los niveles de lípidos totales, triglicéridos, glucosa y colesterol en hembras maduras inducidas hormonalmente al desove.
5. Realizar la identificación y descripción de células sanguíneas en cabrilla sardinera.
6. Comparar el hematocrito, el conteo celular sanguíneo y el porcentaje de eritrocitos, eritroblastos y leucocitos circulantes en plasma, entre cabrillas maduras colectadas en primavera, e inmaduras colectadas en verano de ambos sexos, así como entre hembras y machos inmaduros en cautiverio.
7. Comparar el conteo diferencial de linfocitos, granulocitos, monocitos y trombocitos, entre cabrillas maduras colectadas en primavera, e inmaduras colectadas en verano de ambos sexos, así como entre hembras y machos inmaduros en cautiverio.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 *Captura de Ejemplares*

Se pescaron ejemplares de cabrilla sardinera en la zona de la Isla San José, Baja California Sur, México (24° 52' latitud N y 111° de longitud O), utilizando el arte de pesca de caña y anzuelo. El período de pesca comprendió los meses de abril y mayo para peces maduros y de septiembre para peces inmaduros del 2009. Los peces se transportaron vivos en tanques negros rotoplas de 1000 l., con aireación constante hasta las instalaciones del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

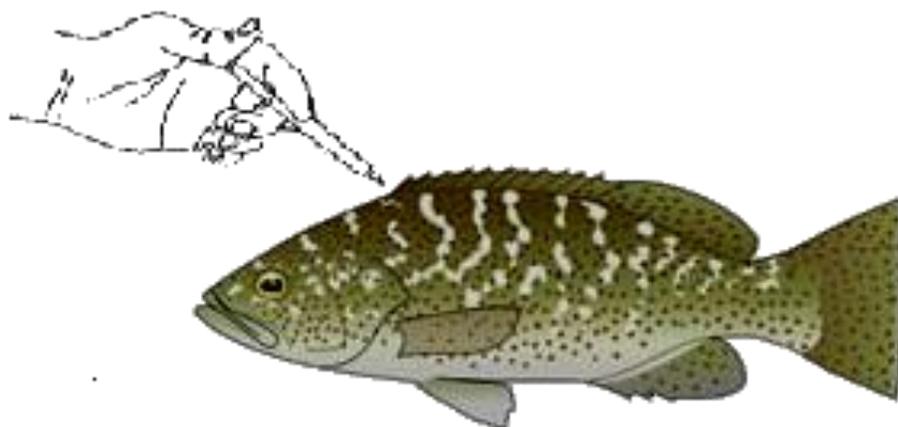
### 5.2 *Diseño Experimental*

#### 5.2.1 *Tratamientos hormonales para la maduración final de cabrilla sardinera*

Para llevar a cabo el tratamiento hormonal las hembras maduras se separaron en cuatro grupos de 6 individuos asignados al azar: 1) Control placebo, 2) GnRHa, 3) LHRHa y 4) hCG. Se mantuvieron en cuatro tanques experimentales interconectados de 3000 L con sistema de recirculación de agua. El agua era pasada por un biofiltro de 500 L de capacidad y posteriormente a una cisterna de 1000 L con cuatro calentadores eléctricos sumergibles de 1000 W con la finalidad de mantener la temperatura del agua de 25-26 °C. La salinidad del agua se mantuvo a 38 ppm, pH a 8.5 y la concentración de oxígeno a 7 mg/L. El recambio de agua fue aproximadamente el 10% cada día.

La concentración hormonal que se aplicó a cada grupo fue la siguiente, de acuerdo a la experiencia en la inducción a la maduración final de ésta especie en el CIBNOR:

- a) Control; solución salina 0.9 NaCl (Placebo),
- b) (LHRHa): 10  $\mu\text{g Kg}^{-1}$
- c) (GnRHa): 10  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ , y
- d) (hCG): 1000 UI



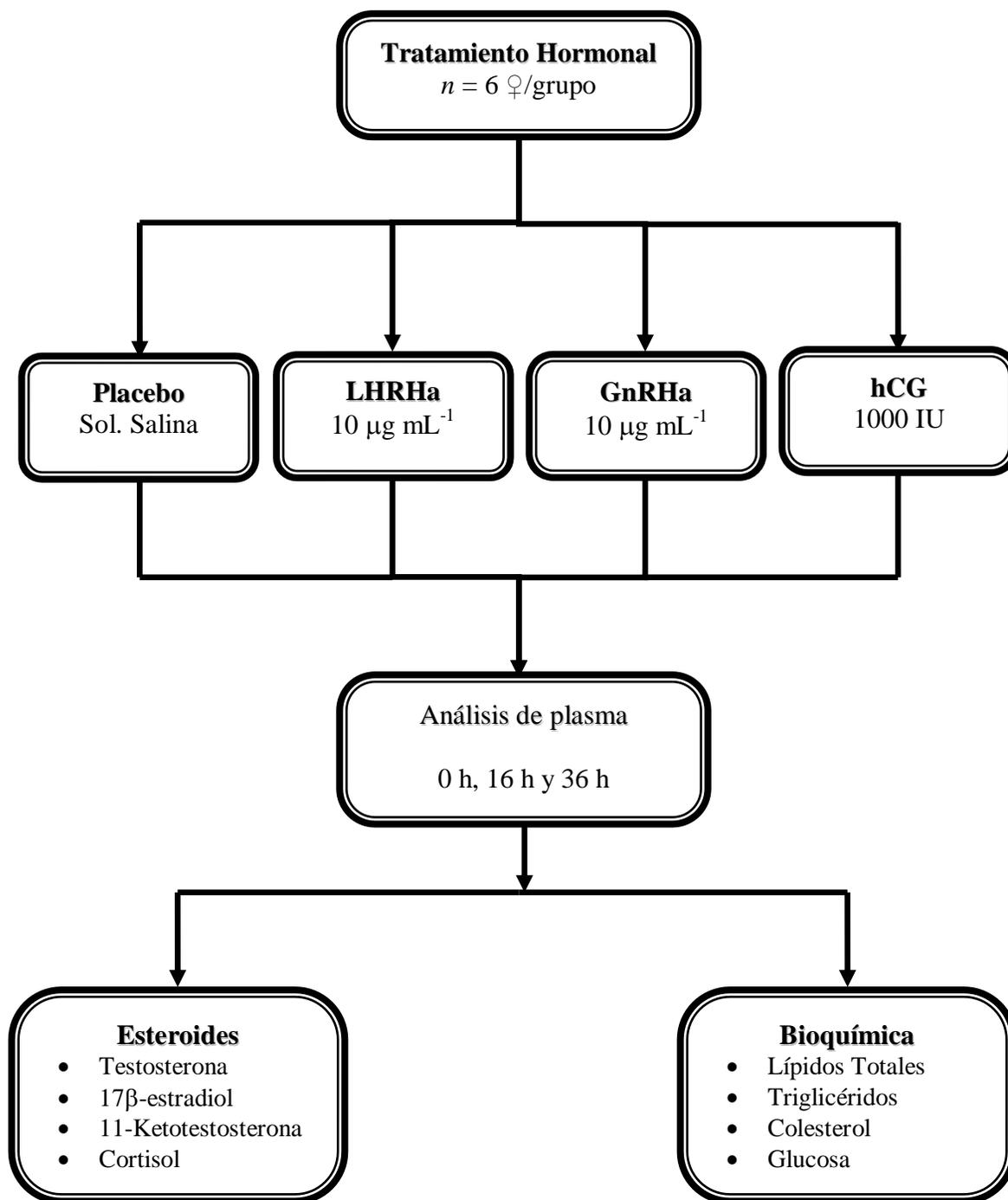
**Figura 8.** Inyección intramuscular en la parte superior dorsal por encima de la línea lateral en cuatro grupos experimentales: solución salina en hembras control, solución de GnRH<sub>a</sub> ( $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ), solución de LHRH<sub>a</sub> ( $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) y solución hCG (1000 UI).

La inyección tanto del placebo como de las hormonas se aplicó con jeringas de 3 mL de manera intramuscular en la parte dorsal superior por encima de la línea lateral a la altura del opérculo (Fig. 8). Se establecieron tres tiempos para la extracción de sangre, previo a la inyección (0 h) y dos posterior a la inyección (16 h y 36 h) (Fig. 9).

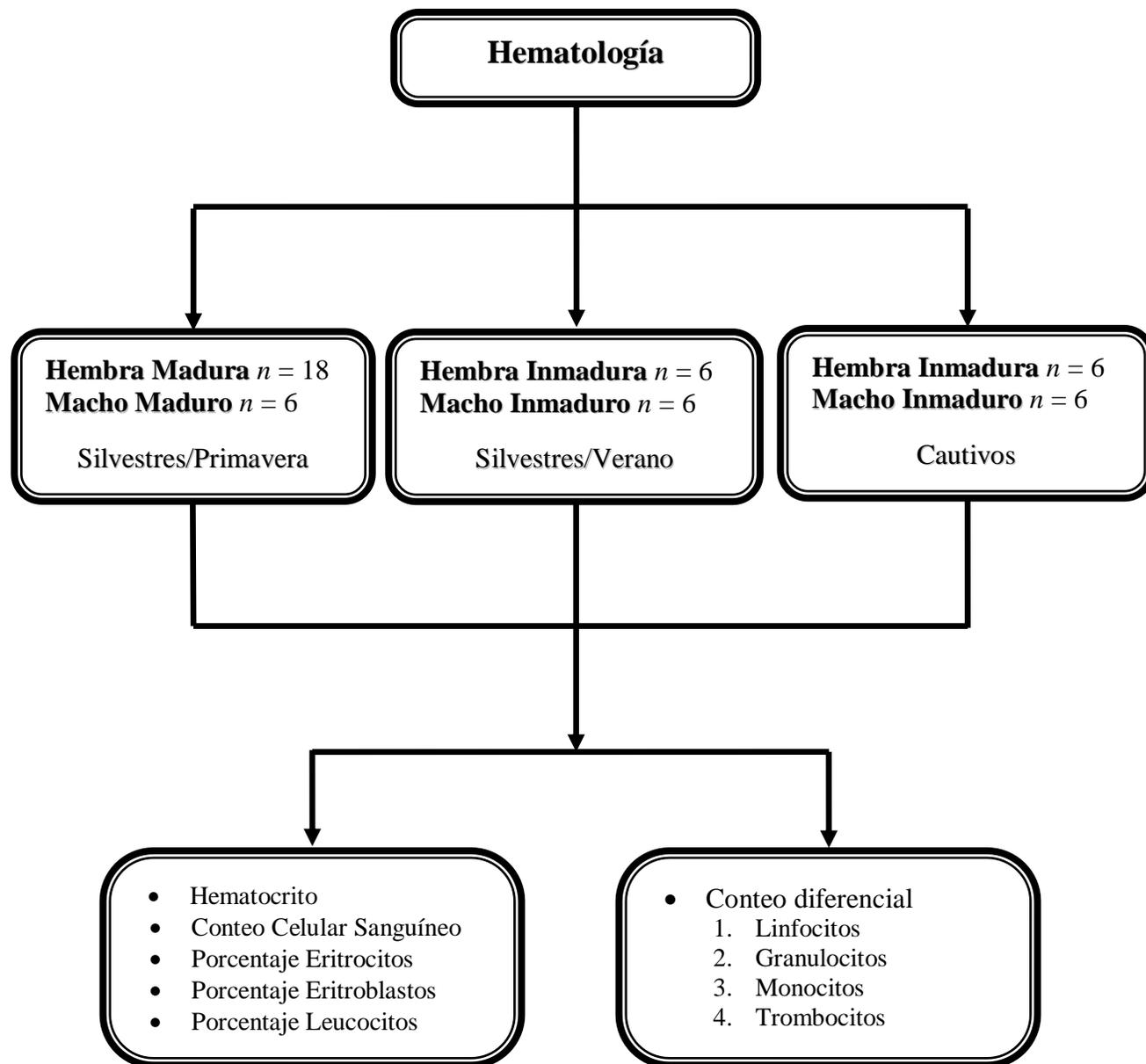
El plasma obtenido de los cuatro grupos experimentales, en los tres tiempos establecidos, se utilizaron para la cuantificación de los esteroides estradiol, testosterona, 11-ketotestosterona y cortisol, así como para la medición de los parámetros bioquímicos tales como glucosa, lípidos totales, triglicéridos y colesterol (Fig. 9).

### 5.2.2 Hematología en cabrilla sardinera silvestre

Para la identificación de los tipos celulares sanguíneos y hematología en sangre circulante se elaboraron frotis sanguíneos (dos por ejemplar) a hembras maduras ( $n = 18$ ) y machos maduros ( $n = 6$ ) y hembras inmaduras ( $n = 6$ ) y machos inmaduros ( $n = 6$ ). Adicionalmente, se elaboraron frotis sanguíneos de hembras ( $n = 6$ ) y machos ( $n = 6$ ) inmaduros que tenían 1 año en cautiverio. El diseño experimental para el análisis de células sanguíneas entre cabrillas maduras e inmaduras silvestres y en cautiverio se presenta en la Fig. 10.



**Figura 9.** Diagrama de flujo del diseño experimental para el desarrollo de los tratamientos hormonales con GnRHa, LHRHa y hCG utilizando hembras silvestres vitelogénicas de la cabrilla sardinera en etapa reproductiva como modelo experimental.



**Figura 10.** Diagrama de flujo del diseño experimental para el análisis de células sanguíneas utilizando hembras y machos silvestres y en cautiverio de cabrilla sardinera.

### **5.3 Identificación de cabrillas maduras y toma de sangre**

En el laboratorio los peces se concentraron en un tanque de 3 m<sup>3</sup>. Previo a la manipulación de los ejemplares, se colocó uno por uno en un tanque de 100 L con agua de mar con 50 mg de metanosulfato/tricaina (MS-222) como anestésico, por 5 min. Una vez dormido el pez se midió la longitud total (cm, LT) y peso total (g, PT). Posteriormente se hizo una observación de la región urogenital del pez y se le aplicó una presión abdominal con la finalidad de determinar el sexo y el estadio de gravidez. Las hembras grávidas se identificaron por un abdomen expandido y una proyección del área urogenital, mientras que los machos maduros por la presencia de esperma fluyente y abundante. Con el objeto de valorizar el grado de maduración de los ovocitos, a las hembras se les realizó una biopsia gonadal (Fig.11) con una cánula de polietileno de 1 mm de diámetro y el tejido se colocó en un portaobjetos y observó en fresco en un microscopio estereoscópico, con un ocular con reglilla de medición. Aquellas hembras maduras que presentaron ovocitos vitelogénicos por presión abdominal o cánula mayores a 450 µm de diámetro ( $n = 30$ ) fueron seleccionadas para llevar a cabo el diseño experimental y marcadas intramuscularmente con etiquetas de color azul. Los machos fluyentes se identificaron con etiquetas de color rojo, etiquetas de color amarillo para hembras inmaduras, y blancas para machos inmaduros de acuerdo a la temporada de captura.



**Figura 11.** Biopsia gonadal realizada a los ejemplares capturados con cánula de polietileno.

Se extrajo sangre de la vena caudal con jeringa heparinizada de 3 mL (Fig. 12) a cada una los ejemplares seleccionados y se depositó en tubos de 5 mL con 100  $\mu$ L de heparina. Los tubos se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 min a 4 °C. Se separó el plasma del resto del paquete celular y se hicieron alícuotas de 200  $\mu$ L en tubos eppendorff de 500  $\mu$ L y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior análisis.



**Figura 12.** Extracción de sangre de la vena cauda con jeringa heparinizada de 3 mL en hembras seleccionadas para la realización de los tratamientos hormonales.

Posterior a la extracción, se les aplicó antiséptico en espray en la zona afectada. Finalmente, a todos los ejemplares se les dio un baño preventivo sanitario con agua dulce para la eliminación de posible presencia de parásitos.

#### **5.4 Histología**

Con el objeto de verificar la condición citológica de madurez gonadal de las cabrillas capturadas durante la primavera, tres hembras que no formaron parte del experimento, fueron escogidas al azar, anestesiadas, sacrificadas y se les disectó una muestra de gónada, la cual fue procesada mediante la técnica histológica de Hematoxilina-Eosina (Humanson, 1977; Mumford 2009).

La técnica histológica se llevó a cabo de la siguiente manera:

*Fijación.* La porción de gónada de cada una de las hembras se colocó en una solución fijadora Davidson's por un periodo no mayor de 48 h a 4 °C. Transcurrido el tiempo se removió la solución fijadora y se almacenó el tejido en etanol 70%.

*Deshidratación.* Con el fin de eliminar el agua, contenida dentro del tejido gonádico, las porciones fijadas se llevaron de una concentración de alcohol etílico de 70% a una de 100% en forma gradual, mezcla EtOH-xilol y xilol absoluto.

*Inclusión.* Terminado el proceso de deshidratación los tejidos fueron embebidos en Paraplast-TX. Posteriormente, se colocaron en placas de inclusión en un Centro de Inclusión LEICA.

*Corte:* Se realizaron cortes en serie en un micrótopo de rotación, LEICA modelo RM2025, a 3-4  $\mu\text{m}$  de grosor para cada una de las gónadas. Los cortes se extendieron en un baño de flotación de teflón con agua a 43-45 °C y gelatina pura al 0.01% por litro y se montaron en porta objetos, donde se secaron a temperatura ambiente.

*Tinción.* Una vez secados los cortes histológicos, el proceso de tinción para la técnica histológica clásica de Hematoxilina-Eosina de Harris (HE), se realizó, sumergiendo los cortes en una serie de soluciones y colorantes (ver Anexo I).

### ***5.5 Cuantificación Esteroides Sexuales y Cortisol***

Para la cuantificación de los niveles de esteroides en plasma de hembras maduras silvestres experimentales de cabrilla sardinera se utilizaron kits comerciales (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) basados en la técnica de *Ensayo por inmovinabsorción ligado a enzimas* de tipo competitivo (Competitive Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA). Se emplearon los siguientes kits: Estradiol EIA Kit (cat. 582251); Testosterone EIA Kit (cat. 582701); 11-ketotestosterone EIA Kit (cat. 582751) y Cortisol EIA Kit (cat. 500360).

Dado que las pruebas inmunoenzimáticas son técnicas muy útiles para analizar cuantitativamente la presencia de compuestos presentes en líquidos orgánicos utilizando

anticuerpos (Makarananda y Neal 1992), se han venido empleando principalmente en el campo de la química clínica y de la endocrinología (Van Weemen y Schuurs 1971; Lequin 2005; Andrade 2006). Se emplea un reactivo de entrecruzamiento para acoplar covalentemente una enzima a un anticuerpo o antígeno que se está utilizando como un análisis para una sustancia concreta. La enzima elegida deberá ser aquella que pueda determinarse con facilidad con una técnica espectrofotométrica (Mathews y Van Holde 1998). Ésta reacción de conjugación antígeno-anticuerpo presenta una gran sensibilidad y especificidad que permite la cuantificación de los compuestos en concentraciones reducidas, del orden de ng/mL o pg/mL (Andrade 2006).

La prueba ELISA de tipo competitivo se fundamenta en la competencia entre el antígeno de la muestra (esteroide problema) y un antígeno (esteroide) conjugado a una enzima (acetilcolinesterasa; AChE) por los sitios de unión del anticuerpo del esteroide (Ac-E<sub>2</sub>, T, 11-kt, Cortisol) que se encuentra en cantidad limitada (Mathews y Van Holde 1998). Dado que la concentración del esteroide conjugado es constante mientras que la concentración del esteroide problema varía, la cantidad de estradiol conjugado que se liga al anticuerpo específico será inversamente proporcional a la concentración de estradiol problema (Andrade 2006).



*Ag*: Antígeno (analito)

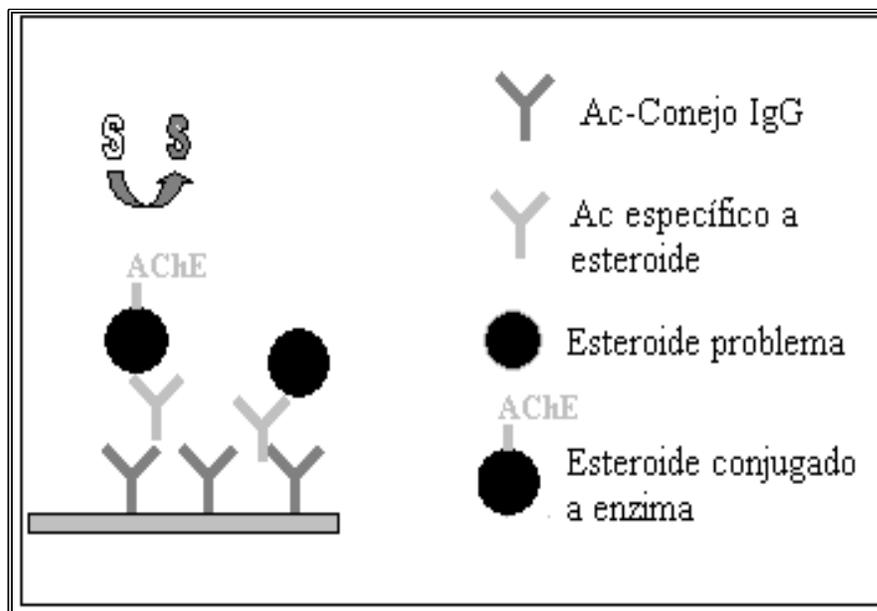
*Ag*<sup>\*</sup>: Antígeno marcado (cantidad constante)

*Ac*: Anticuerpo específico en concentración limitante

*Ka*: Constante de asociación

*Kd*: Constante de disociación

Este complejo anticuerpo-esteroide se une a anticuerpos monoclonales de ratón IgG anti-conejo previamente fijados en las paredes de los pozos de la placa. Se lava la placa con la finalidad de remover todo aquello que no se haya unido y que este suspendido. Posteriormente se agrega un amortiguador que contenga el sustrato para la AChE en los pozos (Fig. 13).



**Figura 13.** Esquematación de un inmunoensayo enzimático competitivo de un solo paso. Modificado de <http://www.ELISA-Development.com>

El producto de esta reacción enzimática de una coloración amarilla y es absorbida a 412 nm en un espectrofotómetro de microplacas Thermo Scientific (Multiskan Spectrum®). La intensidad del color determina, espectrofotométricamente, si es proporcional a la cantidad del esteroide conjugado unido a la pared del pozo, lo cual es inversamente proporcional a la cantidad de esteroide libre presente en el pozo durante el periodo de incubación.

## 5.6 Bioquímica Sanguínea

### 5.6.1 Cuantificación de Lípidos Totales

Para la cuantificación de lípidos totales en sangre los cuatro grupos experimentales, se utilizó el método de la sulfafosfovainillina. Una alícuota de 0.025 mL (25  $\mu$ L) de cada muestra de plasma, se colocó en tubos de vidrio, se les agregó 0.25 mL de ácido sulfúrico concentrado y se incubó a baño maría a 90°C por 10 minutos. Los tubos se enfriaron en baño de hielo, posteriormente se tomó 20  $\mu$ L de cada tubo y se colocaron en el fondo del pozo de una microplaca (placa ELISA) de 96 pozos, se le agregó solución reactiva para

lípidos (fosfovainillina al 0.2% en ácido sulfúrico al 80%) se dejó incubar la placa por 40 min a temperatura ambiente y se tomó la lectura de la placa en un espectrofotómetro de microplacas Thermo Scientific (Multiskan Spectrum®) a 540nm. Al mismo tiempo que las muestras, se hace reaccionar una curva de calibración la cual se preparó de la siguiente manera:

*Curva tipo:* La solución estándar de lípidos (Lin-Trol Sigma L2648) contiene 20 mg/ml, de ésta se preparan diluciones en proporción 1:2, en 1 mL de solución salina, quedando concentraciones de 10, 5, 2.5 1.25, 0.625, 0.3125 y 0.15625, mg mL<sup>-1</sup> de lípidos. Se utiliza solución salina como blanco. La cantidad de lípidos se calcula con la siguiente relación:

$$[\text{Lípidos (mg gr}^{-1})] = (\text{Abs.sol.prob.x FD}) / (m)$$

Donde: m es la pendiente en la curva tipo y FD es el factor de dilución

### 5.6.2 Cuantificación triglicéridos

Para la cuantificación de triglicéridos en sangre de los cuatro grupos, se utilizó una prueba enzimática colorimétrica (kit de RANDOX, No. catalogo TR 1697). Los triglicéridos se determinan a partir de la hidrólisis enzimática con lipasas. El indicador es una quinoínemina formada por peróxido de hidrógeno, 4-aminofenazona y 4-clorofenol, bajo la influencia de una peroxidasa. Esta técnica ha sido adaptada a microplaca de 96 pozos. Se tomó una alícuota del homogeneizado de 20 µL y se colocó en el fondo de una microplaca, se le agregó 200µL de solución reactiva, se incubó 10 minutos y se leyó en un espectrofotómetro de microplacas Thermo Scientific (Multiskan Spectrum®) a una absorbancia de 540 nm.

*Curva tipo:* La solución estándar de triglicéridos contiene 200 mg dL<sup>-1</sup>, de ésta se prepararon diluciones en proporción 1:2, en 1 mL de solución diluyente, quedando concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125 mg dL<sup>-1</sup> de triglicéridos. Se utiliza solución diluyente como blanco (Solución salina, solución fisiológica, SIC, agua destilada, etc. según sea el caso). La cantidad de triglicéridos se calcula con la siguiente relación:

$$[\text{Triglicéridos (mg mL}^{-1})] = (\text{Abs.sol.prob.x FD}) / (m * 100)$$

Donde: m es la pendiente en la curva tipo y FD es el factor de dilución.

### 5.6.3 Cuantificación de Colesterol

Para la cuantificación de colesterol en sangre de los cuatro grupos, se utilizó una prueba enzimática colorimétrica, Método CHOD-PAP (kit de RANDOX, No. catálogo CH200). El colesterol se determina después de la hidrólisis enzimática y oxidación. El indicador quinoneimina se forma a partir de peróxido de hidrógeno y 4-aminoantipirina en presencia de fenol y peróxido. Se tomó una alícuota del homogeneizado de 20  $\mu\text{L}$  y se colocó en el fondo de una microplaca, se le agregó 200  $\mu\text{L}$  de solución reactiva, se incubó 10 minutos y se lee en un espectrofotómetro de microplacas Thermo Scientific (Multiskan Spectrum<sup>®</sup>) a una absorbancia de 540 nm.

*Curva tipo:* La solución estándar de colesterol contiene 200 mg/dL, de ésta se prepararon diluciones en proporción 1:2, en 1 mL de solución diluyente, quedando concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125 mg  $\text{dL}^{-1}$  de colesterol. Se utiliza solución diluyente como blanco (Solución salina, solución fisiológica, SIC, agua destilada, etc. según sea el caso). La cantidad de colesterol se calcula con la siguiente relación:

$$[\text{Colesterol (mg mL}^{-1})] = (\text{Abs.sol.prob.x FD}) / (m * 100)$$

Donde: m es la pendiente en la curva tipo y FD es el factor de dilución.

### 5.6.4 Cuantificación Glucosa

Para la cuantificación de glucosa en sangre de las hembras maduras experimentales de los cuatro grupos, se utilizó una prueba enzimática colorimétrica (kit de RANDOX método GOD-PAP, No. catálogo AY 891). Ésta utiliza como sustrato un p-nitrofenilmalto heptaosido bloqueado por benzilidina. Se utilizan dos enzimas indicadoras: Glucoamilasa, para escindir los productos de la reacción de la amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa para liberar el p-nitrofenol. La glucosa terminal del sustrato es bloqueada químicamente para prevenir la escisión por las enzimas indicadoras. Se tomaron alícuotas de 20  $\mu\text{L}$  y se colocaron en el

fondo de una microplaca, se les agregó 200  $\mu\text{L}$  de solución reactiva, se incubó 13 minutos y se leyó en un espectrofotómetro de microplacas Thermo Scientific (Multiskan Spectrum<sup>®</sup>) a una absorbancia de 490 nm.

*Curva tipo:* La solución estándar de glucosa contiene 100  $\text{mg}^{-1}\text{dL}$ , de ésta se prepararon diluciones en proporción 1:2, en 1mL de solución diluyente, quedando concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 y 1.5625  $\text{mg}^{-1}\text{dL}$  de Glucosa. Se utiliza solución diluyente como blanco (agua destilada). La cantidad de glucosa se calcula con la siguiente relación:

$$[\text{Glucosa (mg gr}^{-1})] = (\text{Abs.sol.prob.x FD}) / (\text{m x Peso de la muestra*100}) \text{ ó}$$

$$[\text{Glucosa (mg mL}^{-1})] = (\text{Abs.sol.prob.x FD}) / (\text{m *100})$$

Donde: m es la pendiente en la curva tipo y FD es el factor de dilución.

### 5.7 Hematología

Se colocó una gota de sangre en un portaobjetos y se extendió sobre él con la ayuda de otro portaobjetos colocado a un ángulo de 45° (Fig. 14). Los frotis se colocaron en metanol por un periodo de 5 min para su fijación y posteriormente se dejaron secar al aire.



**Figura 14.** Elaboración de un frotis sanguíneo de cabrilla sardinera *Mictroperca rosacea*.

Una vez secos, los frotis se tiñeron utilizando el método May Grünwald-Giemsa. Se colocaron los portaobjetos con la sangre de manera horizontal sobre una varilla de vidrio.

Se les agregó colorante May-Grünwald al 0.3% con un gotero hasta cubrirlos en su totalidad y se dejaron por 5 min. Se enjuagaron con abundante agua destilada. Posteriormente, se les agregó colorante de Giemsa al 0.4% con un gotero hasta cubrirlos nuevamente y se dejaron por 20 min. Se enjuagaron copiosamente con agua destilada y se dejaron secar al aire. Se observaron los frotis teñidos bajo un microscopio óptico (Olympus CX31) con una cámara fotográfica digital incorporada (Olympus Evolt E-330).

### *5.7.1 Identificación Células Sanguíneas*

La identificación y conteo celular se realizó con un analizador de imágenes Image-Pro Plus 4.0 software (Media Cybernetics). Cada tipo celular sanguíneo se identificó y describió según lo establecido por Ainsworth (1992) y Fijan (2002). Se midieron 30 células y sus núcleos para determinar de cada una, la longitud media (a), el ancho medio (b) y el volumen promedio (Fijan 2002). Para el volumen, se utilizó la fórmula para una célula elipsoidal (Benfet y Sutterlin 1984) que se representa como:

$$V = 4/3\pi (a/2) (b/2)^2$$

Los valores se presentaron como media  $\pm$  error estándar.

### *5.7.2 Determinación de Hematocrito (Ht)*

Se determinó el valor del hematocrito en todos los ejemplares. Para ello, la sangre extraída se colocó en un micro-hematocrito que fue sellado en uno de sus extremos al calor. Se centrifugó el microtubo en una micro-centrifuga por 5 min a 100 g. El Ht se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Ht (\%)} = [\text{volumen del paquete celular sanguíneo/volumen total de plasma}] \times 100.$$

### *5.7.3 Conteo Celular Sanguíneo*

El conteo celular se llevó a cabo con la ayuda de un hemocitómetro o cámara Neubauer de 0.1 de profundidad (Hausser Scientific, Horsham, PA). Después de colocar la muestra en el

hemocitómetro, la profundidad de la cámara es de 0.1 mm. Por tanto, el volumen total es de 0.1 mm<sup>3</sup>.

Las muestras de sangre se diluyeron previamente 200 veces en NaCL al 0.9% en tubos eppendorff y se agitaron suavemente, con la finalidad de obtener una mezcla homogénea. Posteriormente, se cargó la cámara de recuento y se dejó en reposo por aproximadamente 2 min para permitir la sedimentación de las células sanguíneas presentes en la muestra. Para el conteo de células sanguíneas se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Células por mL} = \text{Promedio de células contadas} \times 10,000 \times 200$$

#### 5.7.4 Porcentaje de Células Sanguíneas

Por cada pez, se tomaron 30 imágenes digitalizadas al azar a una magnificación de 100X y se llevó a cabo el conteo de cada uno de los siguientes tipos celulares sanguíneos: eritrocitos maduros, eritroblastos basófilos, eritroblastos poli/ortocromáticos y leucocitos.

Se obtuvo el promedio de los 30 campos ópticos de cada tipo celular y los valores se representaron en forma de porcentaje calculándolos de la siguiente forma:

$$\frac{\text{Promedio del tipo celular sanguíneo}}{\text{Suma del promedio de todos los tipos celulares}} \times 100$$

Posteriormente, para cada tipo celular se calculó la media  $\pm$  desviación estándar (DS) de todos los peces de un grupo determinado, por ejemplo, “hembras maduras”.

#### 5.7.5 Conteo Diferencial de Leucocitos

El mismo procedimiento se realizó para el conteo diferencial de leucocitos (granulocitos, linfocitos, monocitos) y trombocitos de cada ejemplar. Con la finalidad de visualizar gráficamente los porcentajes de cada tipo de leucocito entre los grupos de peces comparados, por ejemplo “granulocitos de hembras maduras versus granulocitos de hembras inmaduras”, aquel grupo que presentó el mayor porcentaje de leucocitos se refirió al 100% y se utilizó la fórmula:

$$\frac{\text{Porcentaje de un tipo de leucocito de un grupo} \times 100}{\text{Porcentaje más alto de leucocitos}}$$

### ***5.8 Análisis Estadísticos***

Todos los valores obtenidos de los niveles de esteroides sexuales, cortisol y bioquímica sanguínea, así como el diámetro de los ovocitos, están expresados como la media  $\pm$  DS. A los datos se les realizó una prueba de normalidad, Kolmogorov–Smirnov y homogeneidad de varianza, prueba de Levene. En cada una de las variables respuesta se llevó a cabo un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la diferencia estadística fue considerada con un valor de  $P < 0.05$ .

Para los análisis estadísticos de los porcentajes obtenidos de células sanguíneas, los porcentajes promedio fueron inicialmente transformados mediante el arc-sen de la raíz cuadrada de la proporción y se les realizó, igualmente, una prueba de normalidad, Kolmogorov–Smirnov y homogeneidad de varianza, prueba de Levene. Los datos transformados de porcentajes de células sanguíneas fueron comparados entre las dos estaciones (primavera y verano) mediante un ANOVA ( $K = 4$ , ejemplares maduros y ejemplares inmaduros de ambos sexos) o utilizando una prueba de 2-muestras, prueba de  $t$  ( $K = 2$ , entre un grupo maduro y un grupo inmaduro de un sólo sexo, o bien, entre dos perfiles de leucocitos de dos grupos de hembras maduras). En caso de que la normalidad o la homogeneidad de varianzas no se cumplieran, la prueba no-paramétrica de Mann-Whitney, prueba de  $W$  fue aplicada.

El software utilizado para los análisis fue SPSS v. 16.0 (SPSS, Chicago, IL). La diferencia estadística fue considerada con un valor de  $P < 0.05$ .

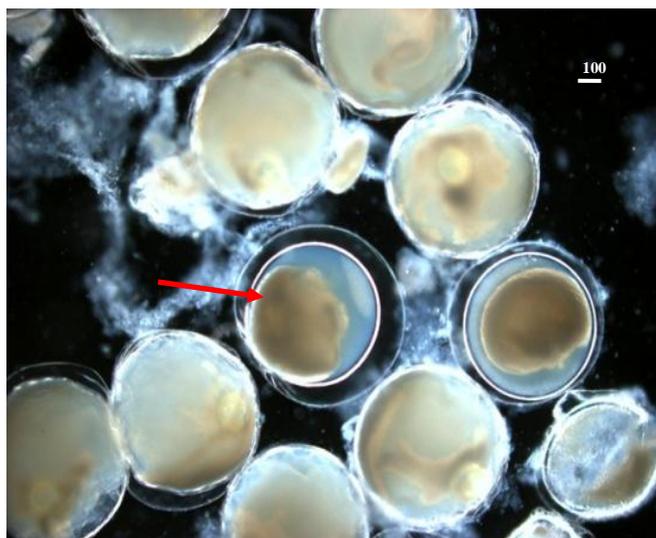
## 6. RESULTADOS

### *6.1 Datos de captura de cabrilla sardinera durante el 2009*

De un total de 58 ejemplares de cabrilla sardinera capturados en la zona de la Isla de San José, BCS, se identificaron 30 hembras y 14 machos sexualmente maduros durante la primavera y 6 hembras y 8 machos inmaduros durante el verano. Los peces presentaron una longitud promedio de  $45.92 \pm 1.92$  cm y un peso promedio de  $1.96 \pm 0.43$  Kg.

### *6.2 Efecto de los tratamientos hormonales en el tamaño de ovocito en las hembras experimentales*

Las muestras ováricas por el método de canulación, mostraron ovocitos vitelogénicos con algunos ovocitos en proceso de hidratación (586  $\mu$ m; flecha) de hembras maduras que fueron utilizadas para la inducción a la maduración final (Fig.15).



**Figura 15.** Biopsia realizada a las hembras capturadas al momento de su llegada al laboratorio (4x). Ovocitos hidratados [flecha]. Barra = 100  $\mu$ m.

### 6.2.1 Histología de hembras maduras

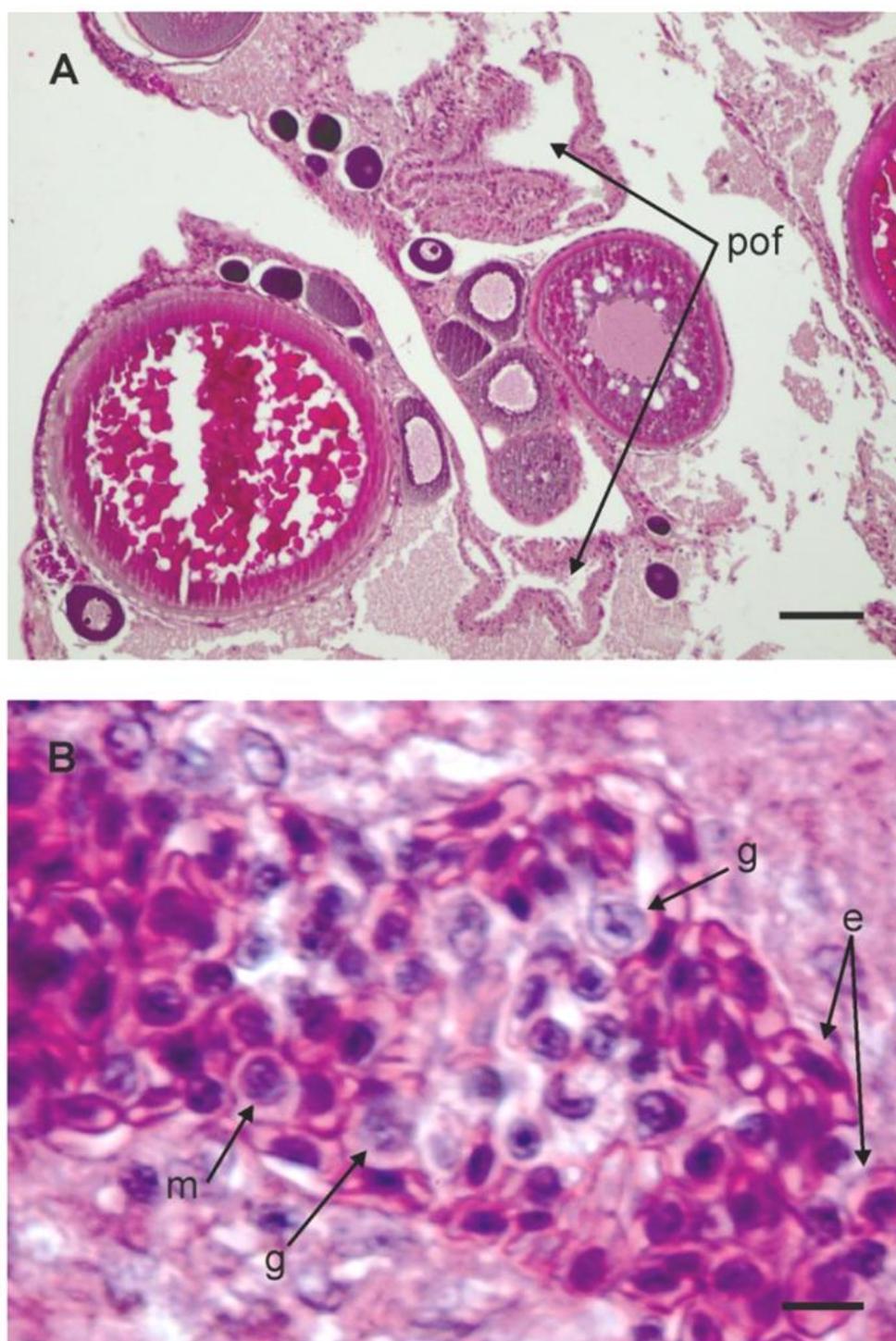
Las muestras de ovocitos de las tres hembras maduras sacrificadas confirmaron el estatus de maduración encontrado por el método de la biopsia ovárica, reafirmando que se trataban de ejemplares potenciales para la inducción de la maduración final (Figs. 16 y 17).

En la Figura 16 se puede observar la presencia de ovocitos en diferentes estadios de maduración: ovogonias (OV), ovocitos maduros (OM), folículos post ovulatorios (FP), ovocitos alveolo cortical (AC) y ovocitos vitelogénicos (Vt).



**Figura 16.** Foto-micrografía de corte histológico de gónada de hembra madura de cabrilla sardinera en tinción de Hematoxilina-Eosina (20x). OV: Ovognias; AC: Alvéolo cortical; Vt: Vitelogénico; OM: Ovocito Maduro; FP: Folículo Post Ovulatorio. Barra = 100  $\mu$ m.

En la Figura 17A se observan ovocitos en diferentes estadios y abundantes folículos post ovulatorios en regresión, lo cual indica un desarrollo de ovocitos asincrónico y multidesoves. En los vasos sanguíneos adyacentes a ovocitos se observaron comúnmente eritrocitos. Sin embargo, en algunas laminillas que presentaron folículos post ovulatorios en regresión, algunos tipos de leucocitos (granulocitos y monocitos) fueron identificados (Fig. 17B).



**Figura 17.** Foto-micrografía de corte histológico de gónada de hembra madura de cabrilla sardinera en tinción de Hematoxilina-Eosina. Ovocitos y folículos post ovulatorios (pof) (A). Barra = 250 µm. Vaso sanguíneo adyacente mostrando eritrocitos (e), granulocitos (g) y monocito (m). Barra = 10 µm.

En la Tabla I se presentan los diámetros promedio de ovocitos después de la captura y traslado al laboratorio y a las 36 horas después de terminados los tres tratamientos hormonales ( $n = 6/\text{tratamiento}$ ) junto con el control placebo ( $n = 6$ ). Se observa que los diámetros promedio de los ovocitos después de la captura en los cuatro grupos experimentales no presentaron diferencias significativas. Sin embargo, el promedio del diámetro de ovocito correspondiente al tratamiento hCG a las 36 horas fue significativamente mayor, comparado con los tratamientos LHRHa y GnRHa, así como el control placebo, los cuales no fueron significativamente diferentes entre sí. A manera de una observación subsecuente, a las 48 h del tiempo experimental, todas las hembras del tratamiento hCG fueron desovadas manualmente.

**Tabla I.** Tamaño de ovocito (Media  $\pm$  Desviación estándar) en la captura y a las 36 horas de los tres tratamientos hormonales y el control placebo en cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*

<b>Tratamiento</b>	<b>Diámetro inicial del ovocito (Captura y traslado)</b>	<b>Diámetro final del ovocito (36 h)</b>
LHRHa 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	480 $\pm$ 80 <sup>a</sup>	520 $\pm$ 60 <sup>a</sup>
GnRHa 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	510 $\pm$ 60 <sup>a</sup>	520 $\pm$ 80 <sup>a</sup>
hCG 1000 IU	460 $\pm$ 100 <sup>a</sup>	780 $\pm$ 60 <sup>b</sup>
Control Placebo	440 $\pm$ 120 <sup>a</sup>	460 $\pm$ 80 <sup>a</sup>

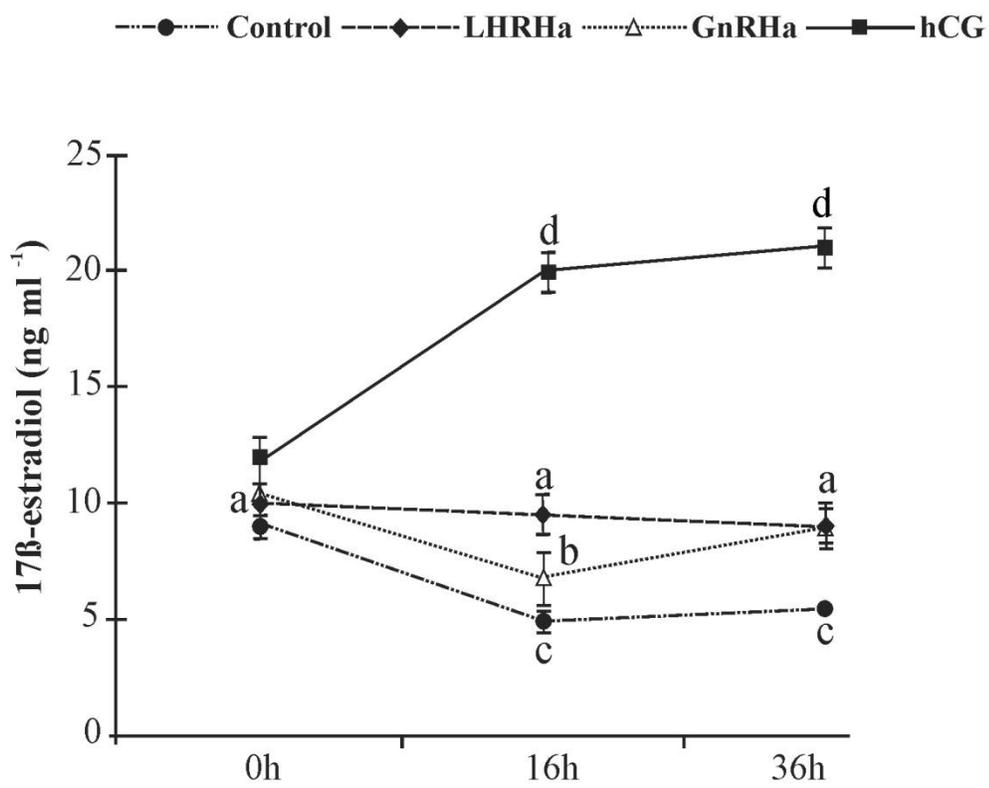
El valor con diferente superíndice denota una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

### ***6.3 Cuantificación de Esteroides Sexuales y Cortisol***

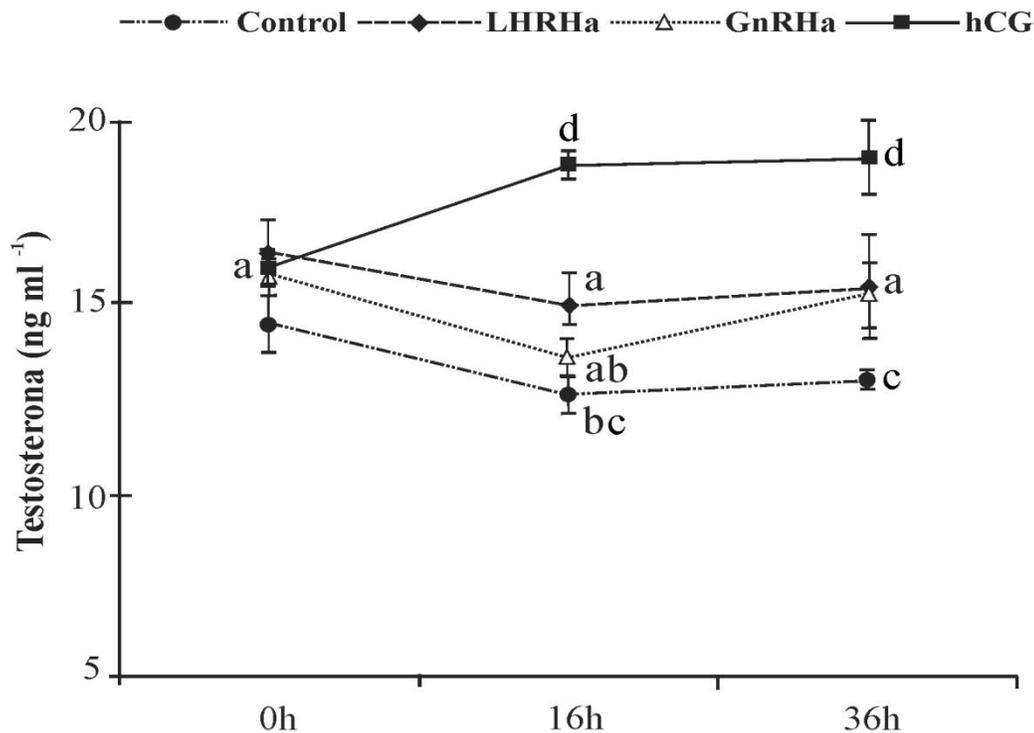
Los valores absolutos (Media  $\pm$  Desviación estándar) de esteroides sexuales y cortisol durante la maduración final de ovocitos se pueden consultar en el Anexo II.

#### ***6.3.1 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) y Testosterona (T) durante la maduración final de ovocitos***

La cuantificación de los esteroides sexuales E<sub>2</sub> y T se observan en la Figura 18 y 19, respectivamente. Los resultados indicaron que no existieron diferencias significativas en el tiempo 0 h entre las concentraciones plasmáticas de ambos esteroides sexuales en los cuatro tratamientos. Sin embargo, las concentraciones plasmáticas de las hembras del tratamiento hCG tuvieron un incremento significativo a partir de las 16 h, que se mantuvo constante hasta las 36 h. Por otro lado, en el grupo control placebo, se observó un decremento significativo a partir de las 16 h que se mantuvo constante y significativamente menor hasta las 36 h. El tratamiento LHRHa no mostró cambios significativos en sus concentraciones a lo largo del experimento, mientras que el tratamiento GnRHa, mostró un decremento significativo a las 16 h, pero se encontró con una concentración no significativa a las 36 h comparada con el tratamiento LHRHa. Los tratamientos GnRHa y LHRHa tuvieron concentraciones plasmáticas significativamente mayores en comparación al tratamiento control placebo de peces a las 36 h.



**Figura 18.** Niveles (Media  $\pm$  Desviación estándar) de Estradiol en plasma de hembras silvestres de cabrillas sardineras experimentales. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos hormonales ( $P < 0.05$ ).



**Figura 19.** Niveles (Media  $\pm$  Desviación estándar) de Testosterona en plasma de hembras silvestres de cabrillas sardineras experimentales. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos hormonales ( $P < 0.05$ ).

#### 6.3.1.1 $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) y Testosterona ( $T$ ) estacionales

Las concentraciones de  $17\beta$ -estradiol y testosterona en plasma de cabrilla silvestre de ambos sexos en estado reproductivo en primavera e inmaduro en verano, se presentan en la Tabla II. Las concentraciones de ambos esteroides sexuales en cabrillas maduras fueron significativamente más altas en comparación a las cabrillas inmaduras. De esta manera se vuelve a confirmar el estatus de maduración encontrado por el método de la biopsia ovárica e histología, reafirmando que se trataban de ejemplares potenciales para la inducción de la maduración final (Figs. 15 y 16).

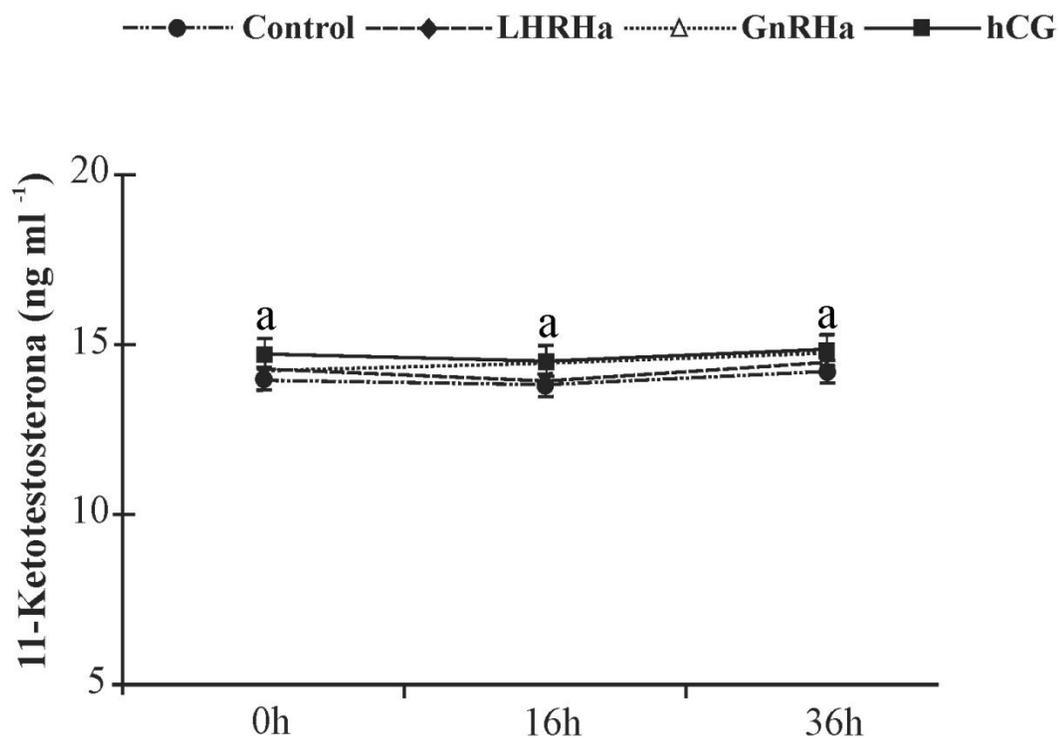
**Tabla II.** Valores de estradiol y testosterona (Media  $\pm$  Desviación estándar) en cabrillas maduras en primavera y cabrillas inmaduras en verano de ambos sexos.

	<b>Hembra madura</b>	<b>Hembra inmadura</b>
	<b>Primavera</b>	<b>Verano</b>
17 $\beta$ -estradiol (ng/mL)	11.0 $\pm$ 0.80 <sup>a</sup>	0.40 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>
Testosterona (ng/mL)	15.5 $\pm$ 0.70 <sup>a</sup>	0.50 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>
	<b>Macho maduro</b>	<b>Macho inmaduro</b>
	<b>Primavera</b>	<b>Verano</b>
17 $\beta$ -estradiol (ng/mL)	1.24 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>
Testosterona (ng/mL)	12.5 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	0.50 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>

Los valores con diferente superíndice indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

### 6.3.2 11-Ketotestosterona

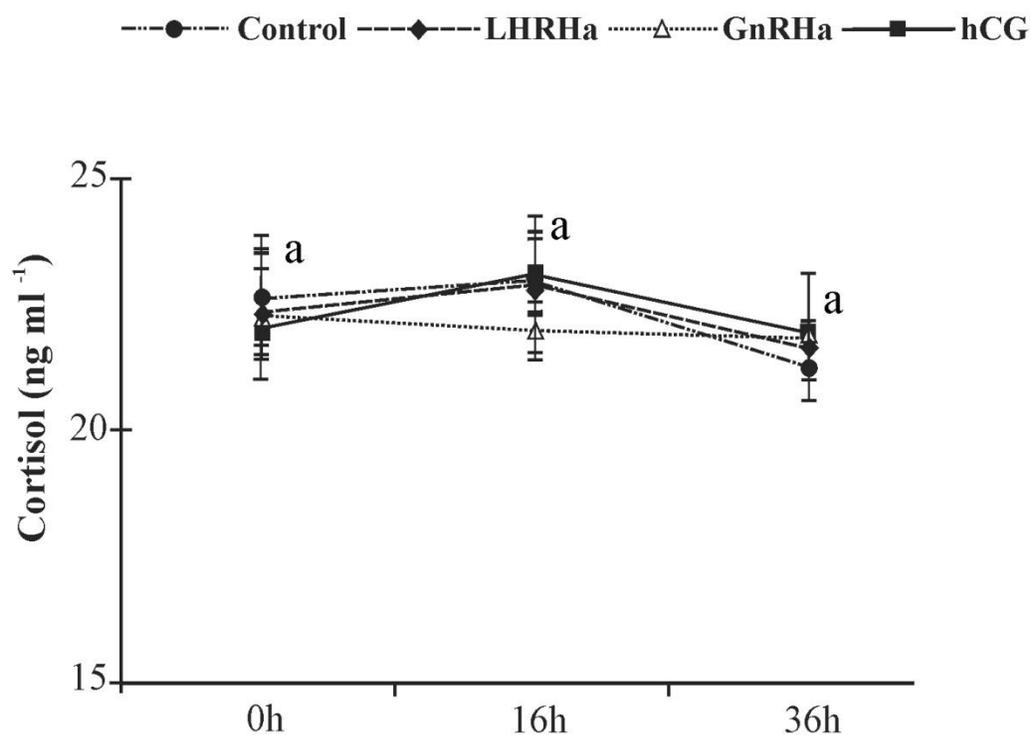
La hormona andrógena 11-ketotestosterona se observó en el plasma de las hembras experimentales y las concentraciones se presentan gráficamente en la Figura 20. Los tratamientos experimentales no mostraron cambios significativos en sus concentraciones a lo largo del tiempo, ni tampoco existieron diferencias significativas entre los tratamientos en cada uno de los tiempos.



**Figura 20.** Niveles (Media  $\pm$  Desviación estándar) de 11-Ketotestosterona en plasma de hembras silvestres de cabrilla sardinera experimentales.

### 6.3.3 Cortisol

Las concentraciones de Cortisol en las hembras experimentales se presentan gráficamente en la Figura 21. De una forma similar a la hormona 11-Ketosterona, todos los tratamientos experimentales no mostraron cambios significativos en sus concentraciones a lo largo del tiempo, ni tampoco existieron diferencias significativas entre los tratamientos en cada uno de los tiempos.



**Figura 21.** Niveles (Media  $\pm$  Desviación estándar) de Cortisol en plasma de hembras de cabrilla sardinera experimentales.

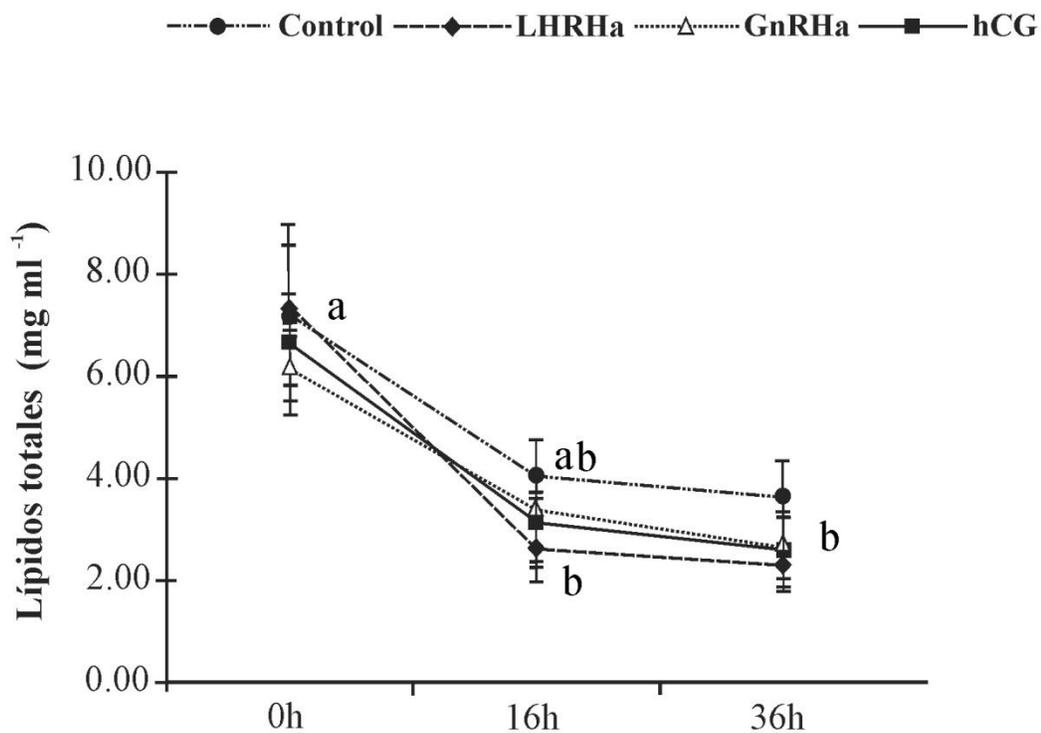
#### 6.4 Cuantificación Bioquímica Sanguínea

Los resultados obtenidos en la cuantificación de los parámetros bioquímicos tales como lípidos totales, triglicéridos, colesterol y glucosa mostraron una movilización de dichas moléculas en los cuatro grupos experimentales a lo largo del tiempo (Figura 22, 23, 24 y 25). Los valores absolutos (Media  $\pm$  Desviación estándar) se pueden consultar en el Anexo III.

##### 6.4.1 Lípidos Totales

El perfil de lípidos totales se muestra en la Figura 22. Se observó una disminución significativa a las 16 h en los tratamientos LHRHa, GnRHa, y hCG y dicha concentración se mantuvo hasta las 36 h. En el caso del control placebo, se diferenció significativamente

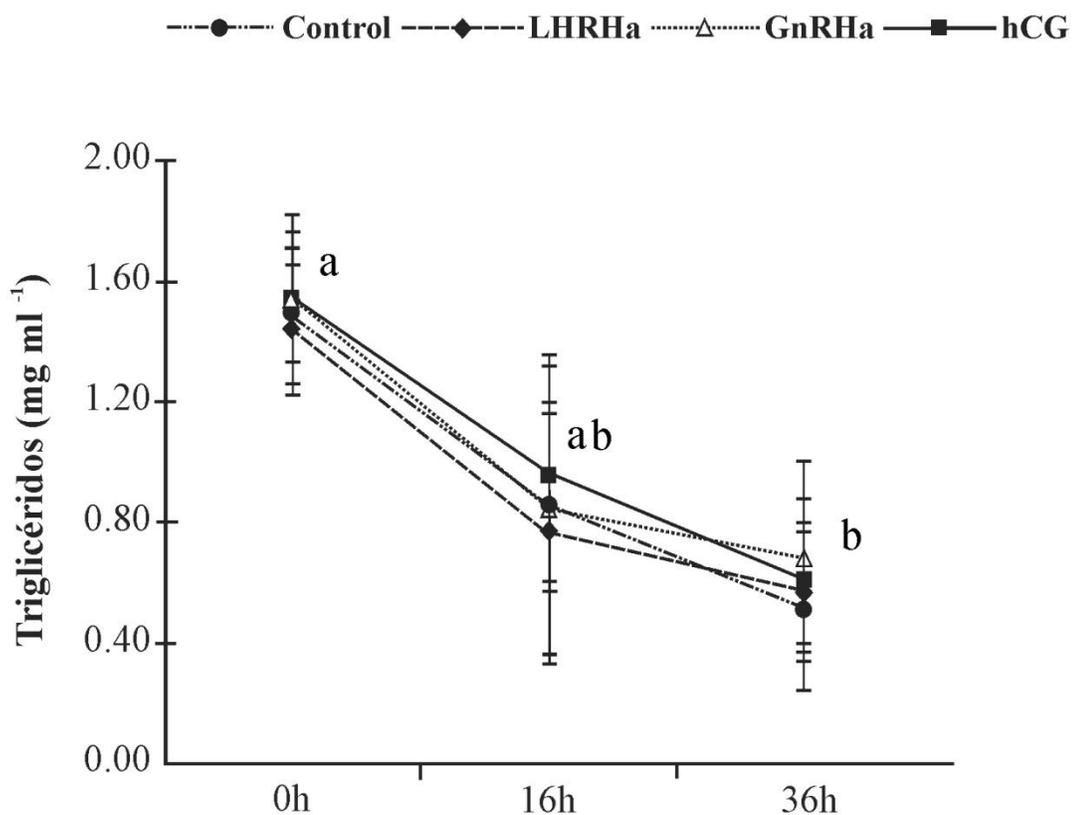
hasta a las 36 h. No existieron diferencias significativas entre los tratamientos en cada uno de los tiempos.



**Figura 22.** Niveles (Media  $\pm$  Desviación estándar) de lípidos totales en plasma de hembras de cabrilla sardinera experimentales. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos hormonales ( $P < 0.05$ ).

#### 6.4.2 Triglicéridos

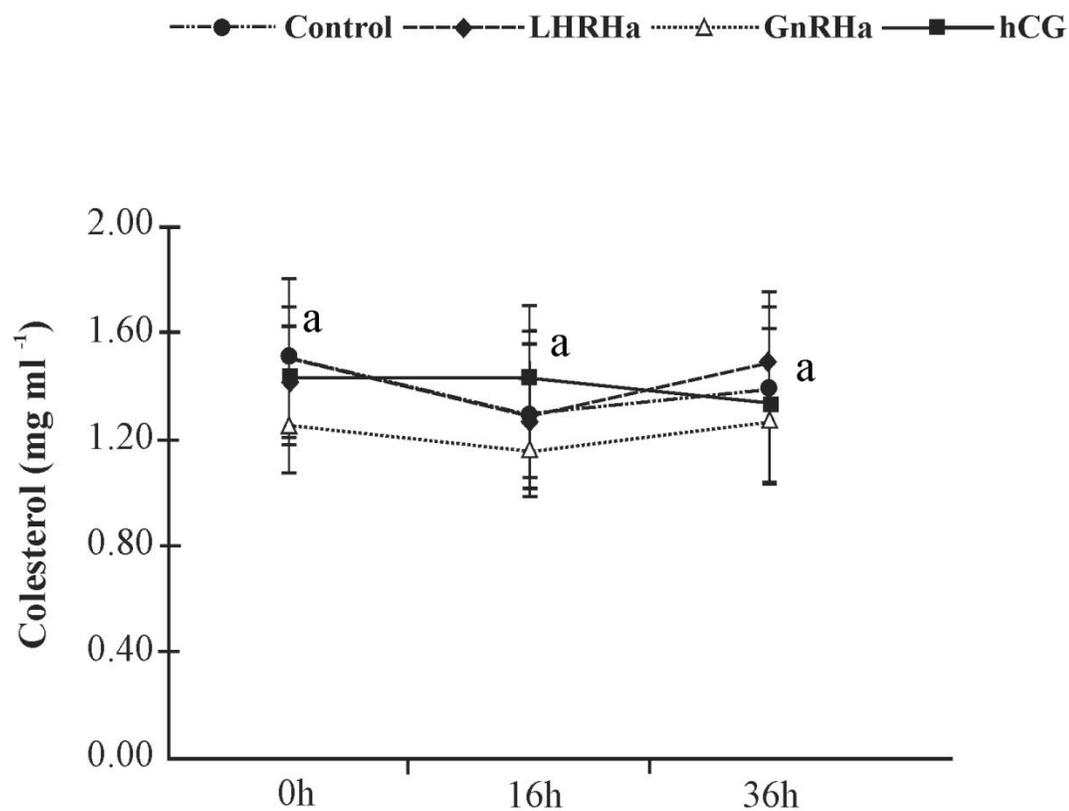
De forma similar a los lípidos totales, los triglicéridos disminuyeron significativamente sus niveles en plasma, tanto en las hembras de los tratamientos hormonales así como el control placebo hasta las 36 h (Fig. 23). No existieron diferencias significativas entre los tratamientos en cada uno de los tiempos.



**Figura 23.** Niveles (Media  $\pm$  Desviación estándar) de Triglicéridos en plasma de hembras de cabrilla sardinera experimentales. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos hormonales ( $P < 0.05$ ).

#### 6.4.3 Colesterol

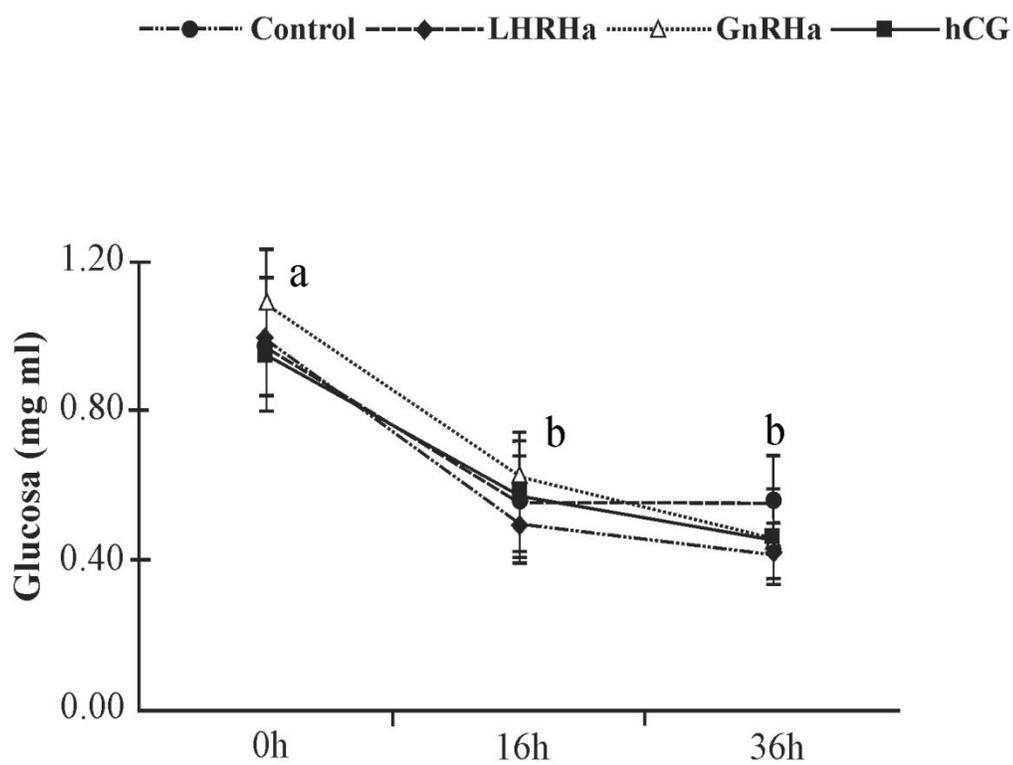
El colesterol no presentó cambios significativos en sus niveles en plasma a lo largo del tiempo tanto en hembras con tratamientos hormonales así como en el control placebo (Fig. 24). Tampoco se presentaron cambios significativos entre los tratamientos en cada uno de los tiempos.



**Figura 24.** Niveles (Media  $\pm$  Desviación estándar) de Colesterol en plasma de hembras de cabrilla sardinera experimentales.

#### 6.4.4 Glucosa

La glucosa disminuyó significativamente sus niveles en plasma, tanto en las hembras de los tratamientos hormonales así como del control placebo a partir de las 16 h (Fig. 25). No existieron diferencias significativas entre los tratamientos en cada uno de los tiempos.



**Figura 25.** Niveles (Media  $\pm$  Desviación estándar) de Glucosa en plasma de hembras de cabrilla sardinera experimentales. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos hormonales ( $P < 0.05$ ).

### 6.5 Tipos de Células Sanguíneas

En el presente trabajo se identificaron y describieron diez tipos de células sanguíneas para la cabrilla sardinera. El tamaño de los tipos celulares sanguíneos identificados así como el tamaño de sus núcleos se presentan en las tablas III y IV respectivamente.

**Tabla III.** Dimensión (Media  $\pm$  Error estándar) de las células sanguíneas presentes en sangre de la cabrilla sardinera.

<b>Tipo Celular Sanguíneo</b>	<b>Largo (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Ancho (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Volumen (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>
Eritrocito Maduro	10.46 $\pm$ 0.13	6.58 $\pm$ 0.11	238.76 $\pm$ 8.22
Eritroblasto basófilo	8.34 $\pm$ 0.09	7.41 $\pm$ 0.10	242.53 $\pm$ 8.40
Eritroblasto Poli/Ortocromático	10.90 $\pm$ 0.14	8.55 $\pm$ 0.13	423.48 $\pm$ 553.88
Granulocito	10.96 $\pm$ 0.13	10.06 $\pm$ 0.13	589.21 $\pm$ 21.47
Linfocito	6.35 $\pm$ 0.14	5.45 $\pm$ 0.17	105.43 $\pm$ 245.14
Monocito	12.48 $\pm$ 0.34	11.06 $\pm$ 0.31	847.01 $\pm$ 64.26
Trombocito	9.86 $\pm$ 0.23	4.02 $\pm$ 0.09	85.02 $\pm$ 4.61

Se identificaron tres tipos de eritrocitos inmaduros (Fig. 26A, B): Eritroblasto basófilo (*be*), Eritroblasto policromático (*pe*) y Eritroblasto ortocromáticos (*oe*). Los *be* presentaron un citoplasma con un borde estrecho de color azul y un núcleo con borde de color púrpura. Los *pe* presentaron un citoplasma de mayor tamaño con una coloración ligeramente azul, un núcleo de forma redonda y ácidofila con coloración rojiza. La diferencia en tamaño del núcleo entre *be* y *pe* es muy evidente, siendo los primeros de menor tamaño. Las células policromáticas se transforman en las ortocromáticas cambiando su forma de redonda a elíptica pero manteniendo las mismas características tintóreas. Los eritrocitos maduros (*e*) fueron las células sanguíneas más abundantes, presentan una

morfología elipsoide con un núcleo ovoide central basofílico de color púrpura y un citoplasma azul claro (Fig. 26B). La presencia de eritrocitos bilobulados (bi) en la sangre periférica de la cabrilla sardinera fue muy escasa (Fig. 26C).

**Tabla IV.** Dimensión (Media  $\pm$  Error estándar) del núcleo de los tipos celulares sanguíneos presentes en la cabrilla sardinera.

<b>Tipo Celular Sanguíneo</b>	<b>largo (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Ancho (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Volumen (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>
Eritrocito Maduro	4.35 $\pm$ 0.05	3.20 $\pm$ 0.06	23.79 $\pm$ 1.01
Eritroblasto Basófilo	4.28 $\pm$ 0.23	3.54 $\pm$ 0.05	28.46 $\pm$ 0.98
Eritroblasto Poli/ortocromático	5.99 $\pm$ 0.11	4.85 $\pm$ 0.12	76.93 $\pm$ 5.69
Granulocito	6.65 $\pm$ 0.11	4.94 $\pm$ 0.12	86.73 $\pm$ 4.74
Linfocito	4.75 $\pm$ 0.11	4.10 $\pm$ 0.13	44.61 $\pm$ 3.45
Monocito	8.52 $\pm$ 0.24	6.80 $\pm$ 0.23	220.54 $\pm$ 19.08
Trombocito	6.45 $\pm$ 0.15	2.61 $\pm$ 0.06	23.51 $\pm$ 1.31

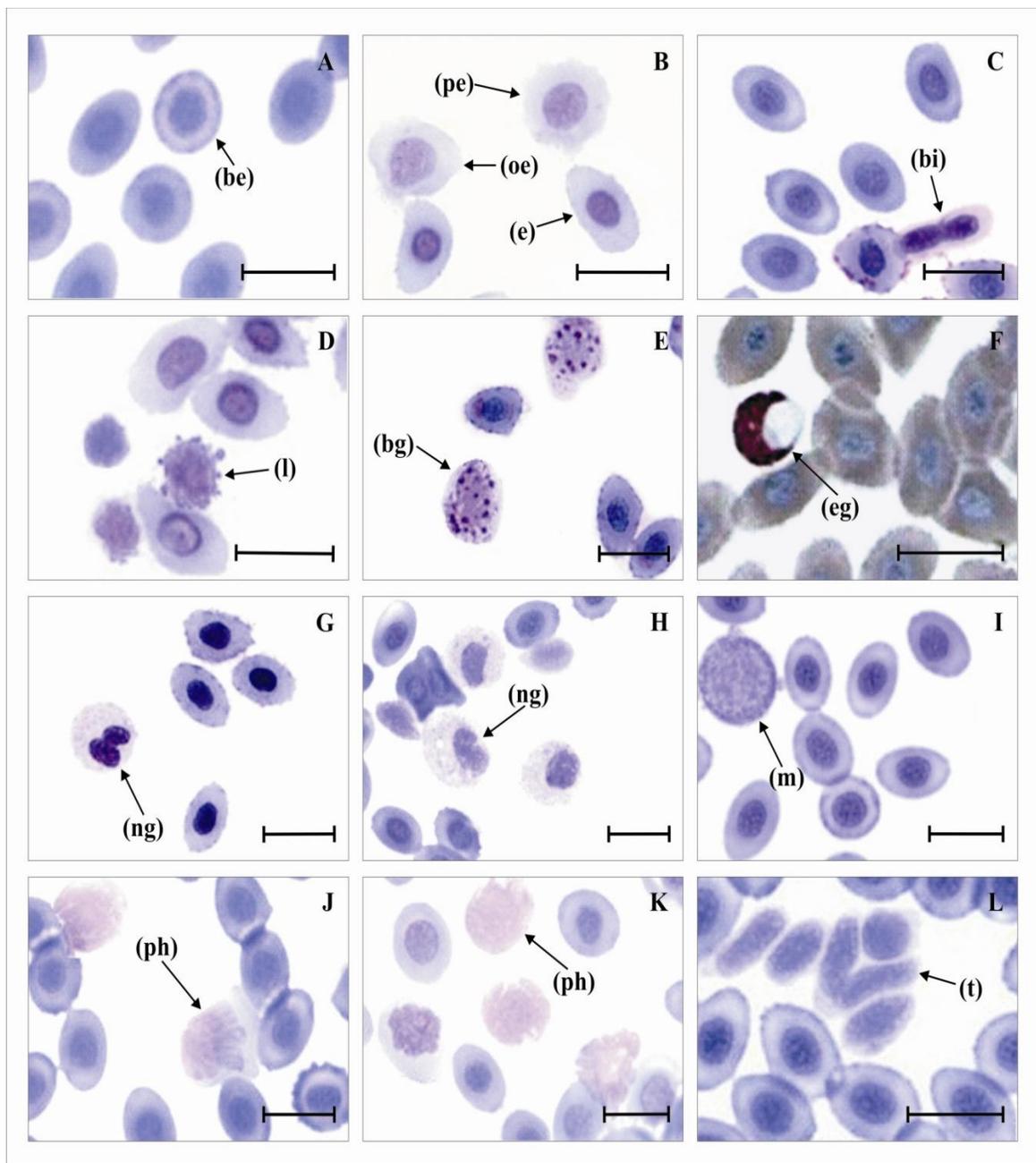
Se identificaron cinco tipos de leucocitos: dos tipos agranulocito y tres tipos granulocito. Dentro del grupo de los agranulocitos están los linfocitos (l). Éstos presentaron una forma esférica con un núcleo basófilo ocupando la casi totalidad del volumen de la célula. Algunos presentaron pseudópodos (Fig. 26D). El otro tipo de agranulocito son los monocitos (m). Fueron las células sanguíneas de mayor tamaño y tanto el citoplasma como el núcleo presentaron una coloración azul oscuro. Al igual que los *l*, algunos *m* presentaban pseudópodos. El núcleo de los *m* ocupa las tres terceras partes del total de la célula, de forma casi redonda con algunas irregularidades y con bloques heterocromáticos densos (Fig. 26I). Se observó la presencia de células macrófagas (ph), solo en las hembras, con forma ameboidea y de tamaño similar a los *m* (Fig. 26J,K). Estas células fagocíticas

presentan un citoplasma hialino con un núcleo eosinófilo de color rosado, con formas variadas, tales como de “nave espacial” o “pelota de beisbol”. Estos *ph* no presentaron pseudópodos como los *l* o *m*. En lugar de ello, el núcleo presenta prolongaciones independientes que se conectan con la superficie del núcleo y están orientados en una sola dirección o acomodados de manera regular formando un círculo, con la capacidad de proyectarse o cambiar de dirección por secciones o todo el núcleo, lo que indica una actividad fagocítica.

Los tres tipos de granulocitos identificados en la sangre de la cabrilla sardinera fueron los basófilos (*bg*) con una forma redonda, un núcleo que ocupa casi el total de la célula y abundantes gránulos de color azul oscuro dentro del citoplasma (Fig. 26E). Los granulocitos eosinófilos presentan una forma redonda, un núcleo bilobulado excéntrico de color rojizo y un citoplasma transparente (Fig. 26F). Su tamaño es ligeramente menor comparado con los neutrófilos.

Los granulocitos neutrófilos (*ng*) presentan una forma redonda con un núcleo excéntrico de coloración púrpura y un citoplasma tenuemente azulado con ligeras incrustaciones de gránulos (Fig. 26G,H). Se observaron diferentes formas del núcleo, esférica, oval, bilobulada, de hígado. Este tipo de célula fue el mayor tamaño y más abundante dentro del grupo de los granulocitos.

Los trombocitos (*t*) presentaron varias formas y tamaños, principalmente elongados y con atenuación en ambos lados del final de la célula. Generalmente se observan formando agregaciones. El núcleo de color azul oscuro presentaba la misma forma de la célula, cubriendo casi en su totalidad el contenido de la misma. El citoplasma presenta una coloración tenuemente azul (Fig. 26L).



**Figura 26.** Tipos de células sanguíneas presentes en hembras de cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*.

Aumento a 100X. Abreviaciones: Eritrocito Maduro (e), Eritroblasto Basófilo (be), Eritroblasto Policromático (pe), Eritroblasto Ortocromático (oe), Eritrocitos Bi-lobulado (bi), Linfocito (l), Granulocito Basófilo (bg), Granulocito Eosinófilo (eg), Granulocito Neutrófilo (ng), Monocito (m), Macrófago (ph), Trombocito (t).

## 6.6 Hematología

### 6.6.1 Hematocrito (Ht) en *Cabrilla sardinera silvestre*

Los valores en porcentaje del Ht para hembras y machos maduros silvestres en primavera e inmaduros silvestres en verano se muestran en la Tabla V. Tanto las hembras como machos en estadio reproductivo presentaron valores significativamente más bajos en comparación con los valores observados en las hembras y machos inmaduros.

**Tabla V.** Valores (Media  $\pm$  Desviación estándar) de hematocritos de ejemplares de cabrilla sardinera silvestre en estadio reproductivo e inmaduro.

	<b>Hembra madura</b>	<b>Macho Maduro</b>	<b>Hembra Inmadura</b>	<b>Macho Inmaduro</b>
Hematocrito (%)	32.0 $\pm$ 2.50 <sup>a</sup>	32.36 $\pm$ 2.22 <sup>a</sup>	38.48 $\pm$ 2.60 <sup>b</sup>	37.40 $\pm$ 2.00 <sup>b</sup>

Los valores con diferente superíndice presentan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

### 6.6.2 Hematocrito en *Cabrilla Sardinera en Cautiverio*

Los valores en porcentaje del Ht para hembras y machos inmaduros cautivos se muestran en la Tabla VI. No se observó una diferencia significativa entre los sexos. Los valores de Ht no fueron significativamente diferentes con respecto a las hembras y machos inmaduros silvestres referidos en la Tabla V. Sin embargo, sí fueron significativamente más altos con respecto a las hembras y machos maduros silvestres referidos en dicha Tabla.

**Tabla VI.** Valores (Media  $\pm$  Desviación estándar) de hematocrito de ejemplares de cabrilla sardinera inmadura en cautiverio.

	<b>Hembra</b>	<b>Macho</b>
Hematocrito (%)	41 $\pm$ 3.54 <sup>a</sup>	39 $\pm$ 2.26 <sup>a</sup>

### 6.6.3 Conteo de Células Sanguíneas (CS) en *Cabrilla sardinera silvestre*

Los valores obtenidos del conteo de células sanguíneas de hembras y machos maduros e inmaduros silvestres se muestran en la Tabla VII. Las hembras y machos maduros presentaron cantidades significativamente menores de CS comparado con los CS observadas en hembras y machos inmaduros.

**Tabla VII.** Valores (Media  $\pm$  Desviación estándar) del conteo de células sanguíneas de ejemplares de cabrilla sardinera silvestre en estadio reproductivo e inmaduro.

	<b>Hembra madura</b>	<b>Macho Maduro</b>	<b>Hembra Inmadura</b>	<b>Macho Inmaduro</b>
CS ( $\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ )	$1.46 \pm 0.40^a$	$1.48 \pm 0.38^a$	$2.56 \pm 0.52^b$	$2.70 \pm 0.52^b$

Los valores con diferente superíndice presentan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

### 6.6.4 Conteo de Células Sanguíneas (CS) en *Cabrilla sardinera en cautiverio*

Los valores obtenidos del conteo de células sanguíneas de hembras y machos inmaduros cautivos se muestran en la Tabla VIII. No se observó una diferencia significativa entre los sexos. De igual manera que el Ht, los valores de CS no fueron significativamente diferentes con respecto a las hembras y machos inmaduros silvestres referidos en la Tabla VII. Sin embargo, sí fueron significativamente más altos con respecto a las hembras y machos maduros silvestres referidos en dicha Tabla.

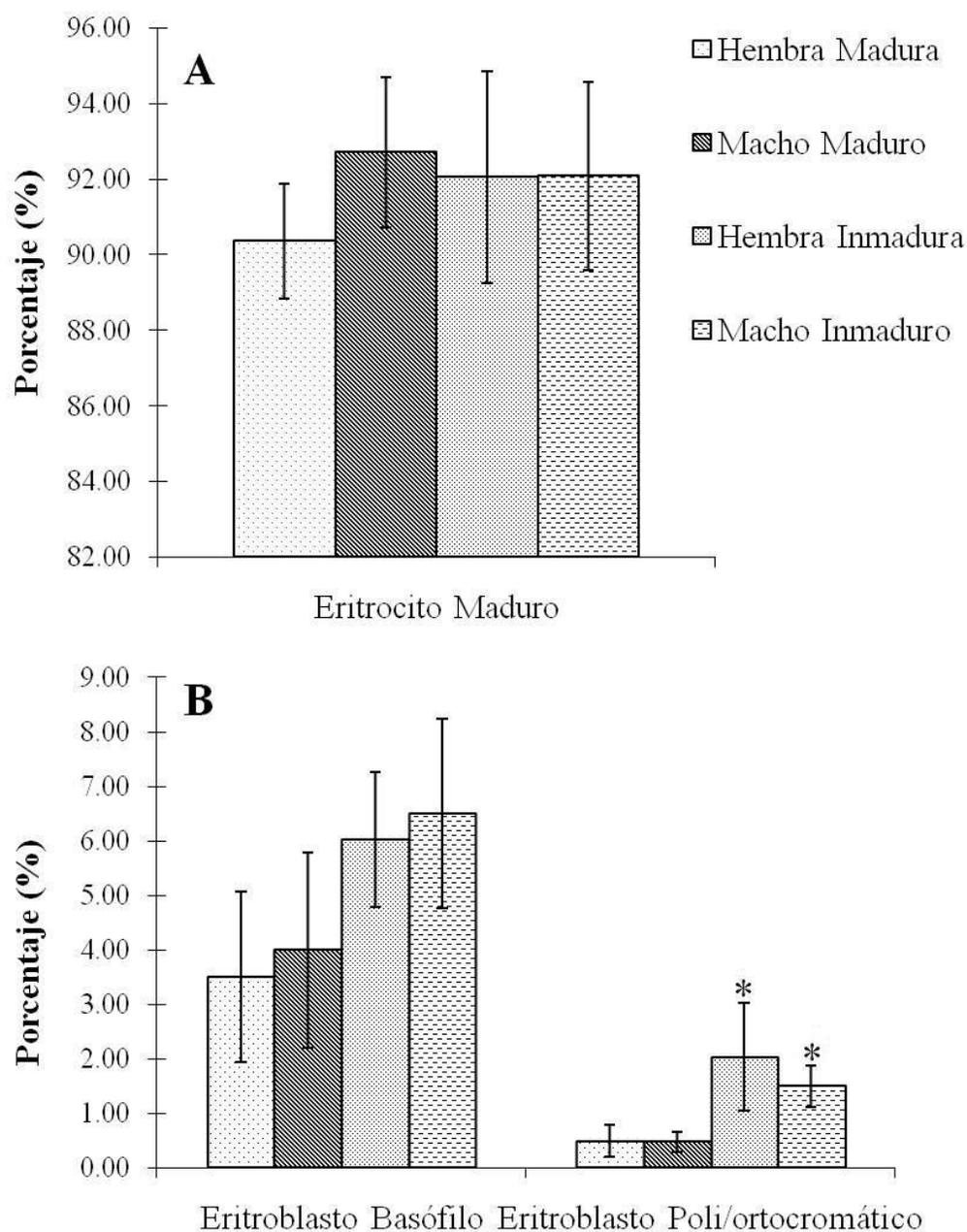
**Tabla VIII.** Valores (Media  $\pm$  desviación estándar) del conteo de células sanguíneas de ejemplares de cabrilla sardinera inmadura en cautiverio.

	<b>Hembra</b>	<b>Macho</b>
CS ( $\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ )	$2.86 \pm 0.40^a$	$2.80 \pm 0.60^a$

#### *6.6.5 Porcentaje de Células Sanguíneas en Cabrilla sardinera silvestre en primavera y verano*

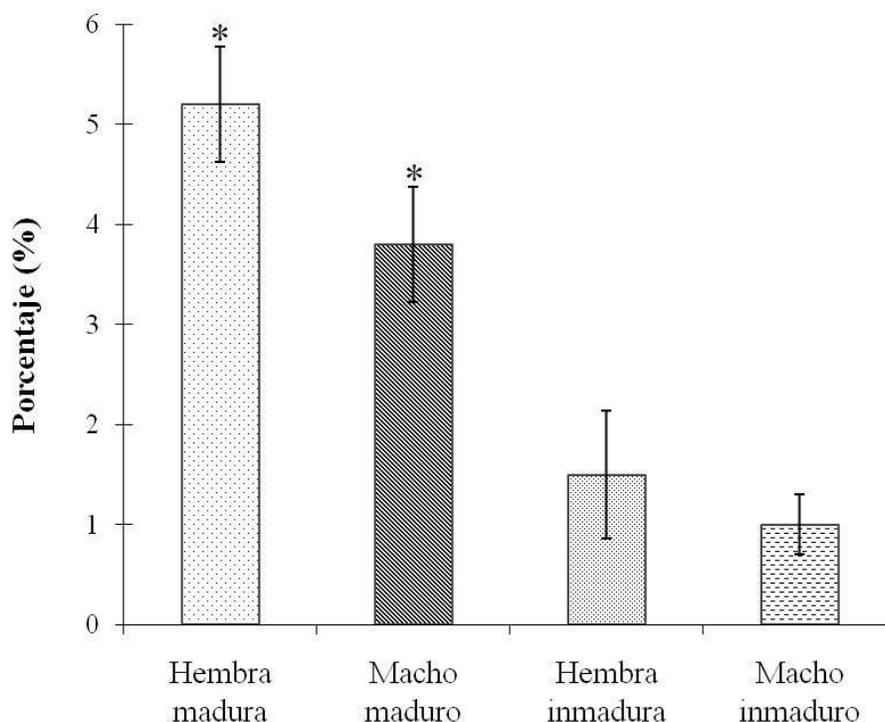
De acuerdo al porcentaje de células rojas realizadas en hembras y machos silvestres, maduros en primavera e inmaduros en verano, la presencia de eritrocitos maduros fue alrededor del 90% del paquete celular sanguíneo. Aunque las hembras maduras silvestres mostraron un menor porcentaje ( $\approx 90\%$ ) en comparación con los machos maduros y hembras y machos inmaduros silvestres, no se observó ninguna diferencia significativa entre ellos (Fig. 27A).

Los eritroblastos basófilos variaron entre un 3 y 7%. Fue en las hembras y machos maduros silvestres donde se observó un menor porcentaje de éste grupo celular en comparación con los inmaduros, sin obtener una diferencia significativa entre los cuatro grupos. Sin embargo, los eritroblastos poli/ortocromáticos variaron entre 0.5 y 2% y se observaron valores significativamente menores en los ejemplares maduros en comparación con los inmaduros (Fig. 27B).



**Figura 27.** Porcentajes de eritrocitos en hembras y machos silvestres de cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* en estadio maduro e inmaduro ( $n = 6$ ). A) Eritrocitos maduros; B) Eritroblastos basófilos y poli/ortocromáticos. Asteriscos indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

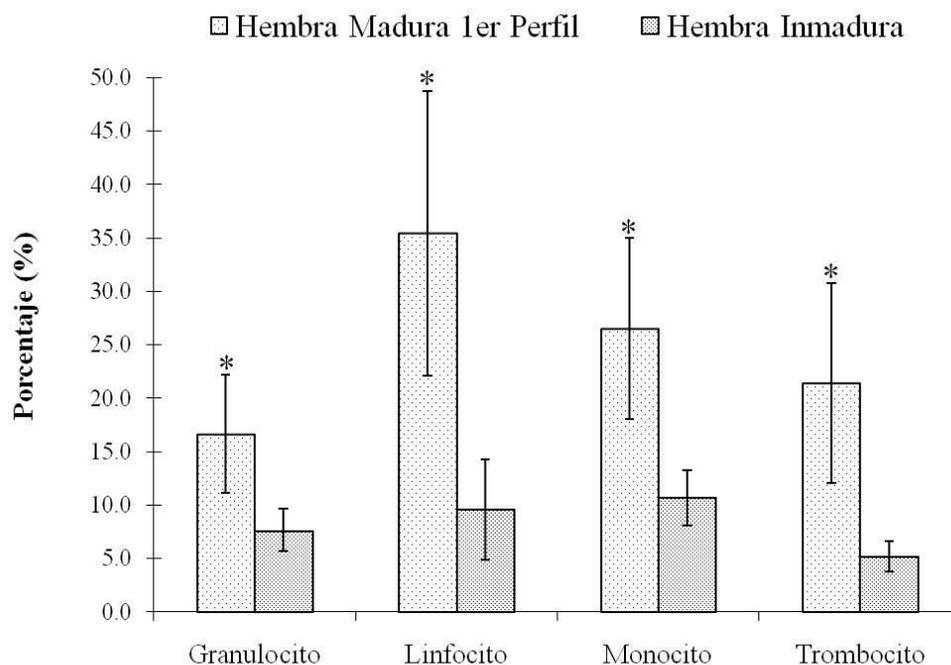
Los porcentajes de leucocitos y trombocitos comprendieron un rango del 1 al 5% del total del paquete celular sanguíneo. Las hembras en estadio reproductivo presentaron el porcentaje más alto y significativo, comparado con los otros grupos. Adicionalmente, el porcentaje de estas células en los machos maduros fue también significativamente más alto que en las cabrillas inmaduras de ambos sexos (Fig. 28).



**Figura 28.** Porcentajes de leucocitos y trombocitos en hembras y machos silvestres de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* en estadio maduro e inmaduro. Asteriscos indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

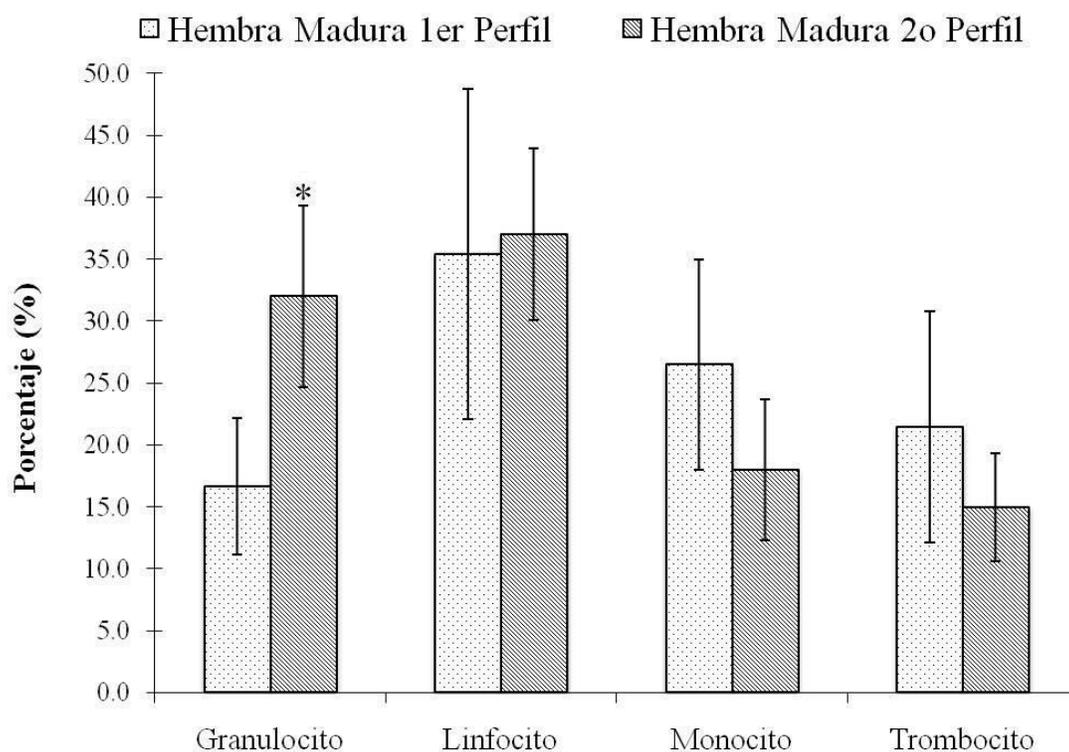
El conteo diferencial de leucocitos y trombocitos reveló que todas las hembras maduras presentaron un aumento significativo en cada uno de los tipos de células en comparación a las hembras inmaduras. De las 18 hembras maduras analizadas, se clasificaron tres perfiles diferenciales sobre la base de los porcentajes de granulocitos y monocitos que fueron los tipos celulares que más variaron. El primer perfil y el más tipificado en la muestra de hembras maduras ( $n = 12$ ), mostró una leucofilia y trombofilia significativas en comparación con el perfil diferencial de leucocitos y trombocitos de las

hembras inmaduras ( $n = 6$ ), en donde los porcentajes de granulocitos y trombocitos fue escaso y de linfocitos y monocitos fue baja (Fig. 29). El radio de granulocitos y monocitos en las hembras maduras fue de  $0.50 \pm 0.10$ .



**Figura 29.** Primer perfil diferencial de leucocitos y trombocitos de hembras maduras *versus* perfil de hembras inmaduras de *Mycteroperca rosacea*. Asteriscos señalan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

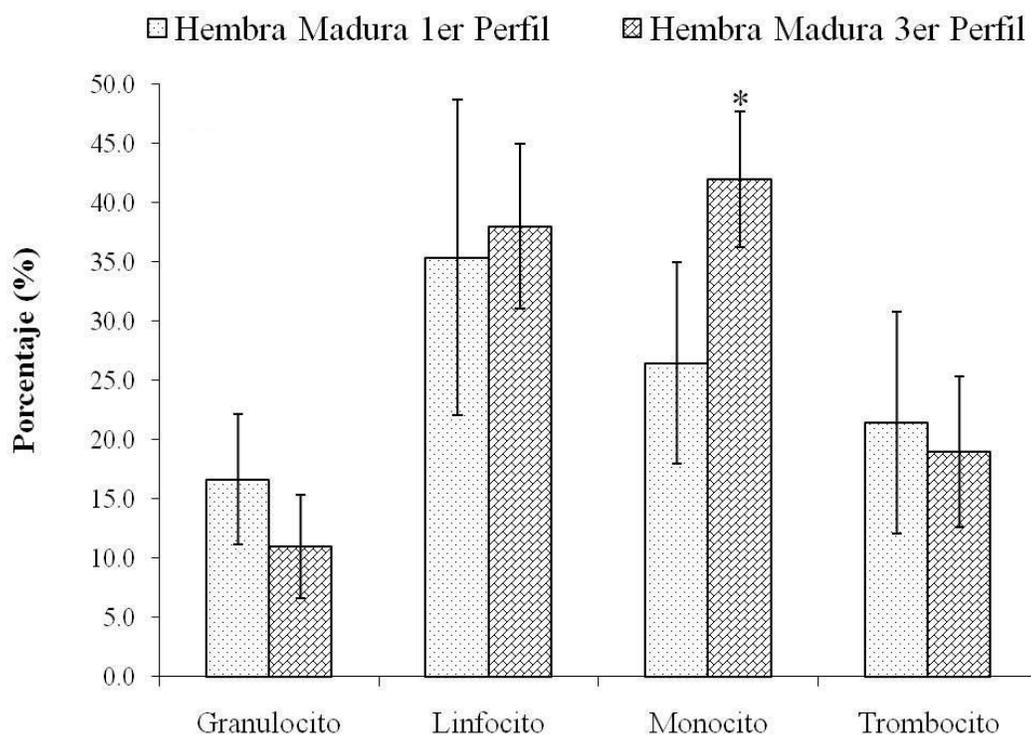
El segundo perfil ( $n = 3$ ) reveló una granulofilia significativa comparado con las hembras maduras del primer perfil (Fig. 30). Se observa que los porcentajes de linfocitos, monocitos y trombocitos entre los dos grupos de hembras maduras, no presentaron diferencias significativas. El radio de granulocitos y monocitos en estas hembras maduras fue de  $1.7 \pm 0.10$ .



**Figura 30.** Primer perfil diferencial de leucocitos y trombocitos *versus* segundo perfil de hembras maduras de *Mycteroperca rosacea*. Asterisco señala una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

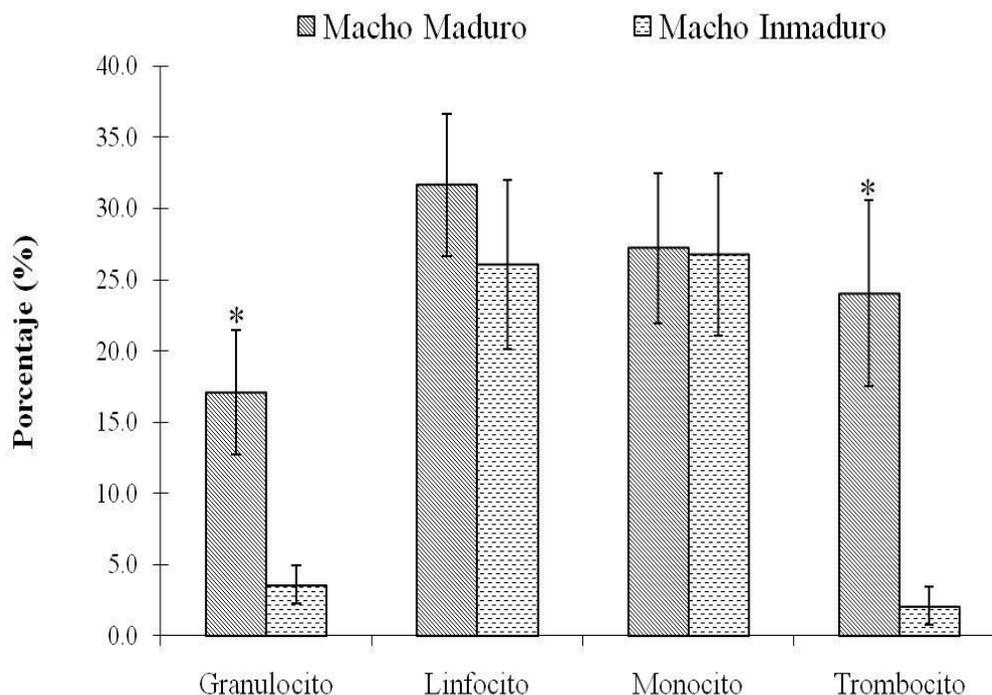
El tercer perfil ( $n = 3$ ) presentó una monofilia significativa comparado con las hembras maduras del primer perfil (Fig. 31). Se observa que los porcentajes de linfocitos, granulocitos y trombocitos entre los dos grupos de hembras maduras, no presentaron diferencias significativas. EL radio de granulocitos y monocitos en estas hembras maduras fue de  $0.15 \pm 0.05$ .

En cuanto a componentes bioquímicos y esteroideos analizados en los tres tipos de leucogramas, no se encontraron diferencias significativas.



**Figura 31.** Primer perfil diferencial de leucocitos y trombocitos *versus* tercer perfil de hembras maduras de *Mycteroperca rosacea*. Asterisco señala una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

En el caso de los machos maduros ( $n = 6$ ) se observaron porcentajes significativamente más altos en granulocitos y trombocitos al compararlo con el perfil de leucocitos de los machos inmaduros ( $n = 6$ ) (Fig. 32).

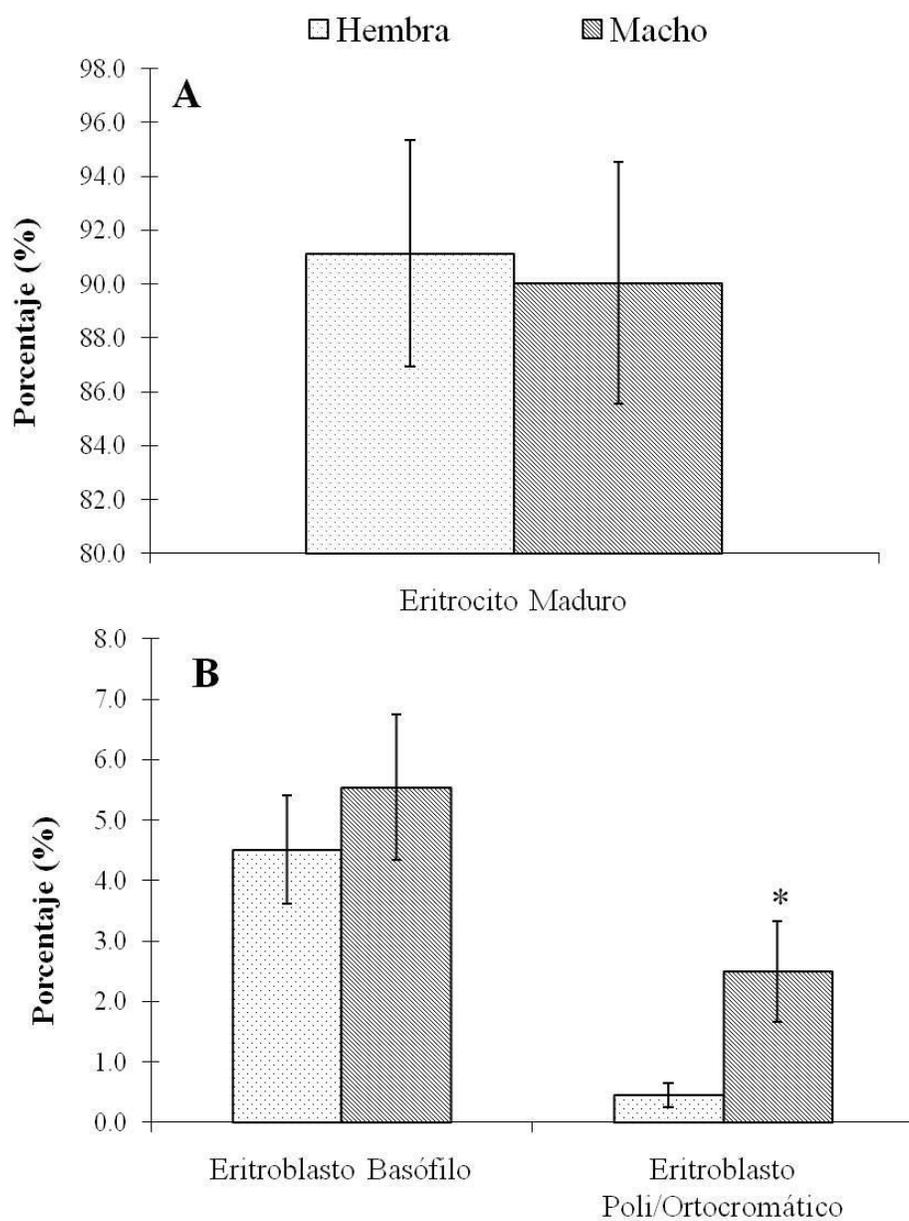


**Figura 32.** Perfil diferencial de leucocitos en machos maduros *versus* perfil de machos inmaduros silvestres de *Mycteroperca rosacea*. Asteriscos señalan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

#### 6.6.6 Porcentaje de Células Sanguíneas en Cabrilla sardinera en cautiverio

Al igual que en los peces silvestres, el porcentaje de células sanguíneas rojas señaló que los eritrocitos maduros representaron, en promedio, el  $\approx 90\%$  del total del paquete celular sanguíneo en los ejemplares cautivos de ambos sexos. El porcentaje promedio de eritrocitos maduros entre machos y hembras inmaduras cautivas no mostró una diferencia significativa (Fig. 33A).

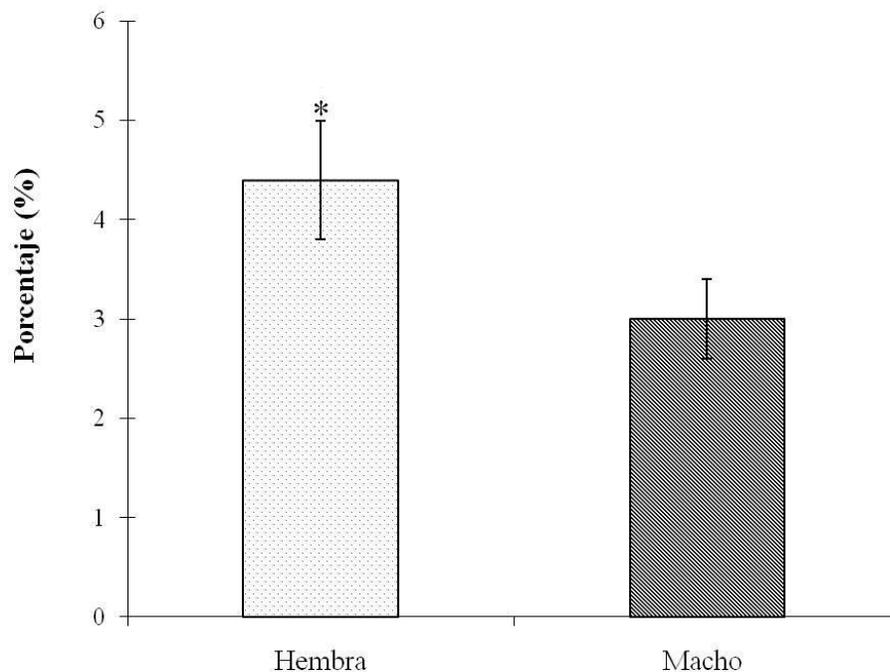
El porcentaje promedio de eritroblastos basófilicos varió entre un 4 y 7% y no se observó una diferencia significativa entre ambos sexos. Los eritroblastos poli/ortocromáticos variaron entre un 0.5 y 3.0%. Estas células se observaron con un porcentaje significativamente más alto en comparación a los machos inmaduros (Fig. 33B).



**Figura 33.** Perfil de eritrocitos en hembras y machos inmaduros cautivos de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*. A) Porcentaje de eritrocitos maduros; B) Porcentaje de eritroblastos basófilos y poli/ortocromáticos. Media  $\pm$  Desviación estándar. Asterisco señala una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

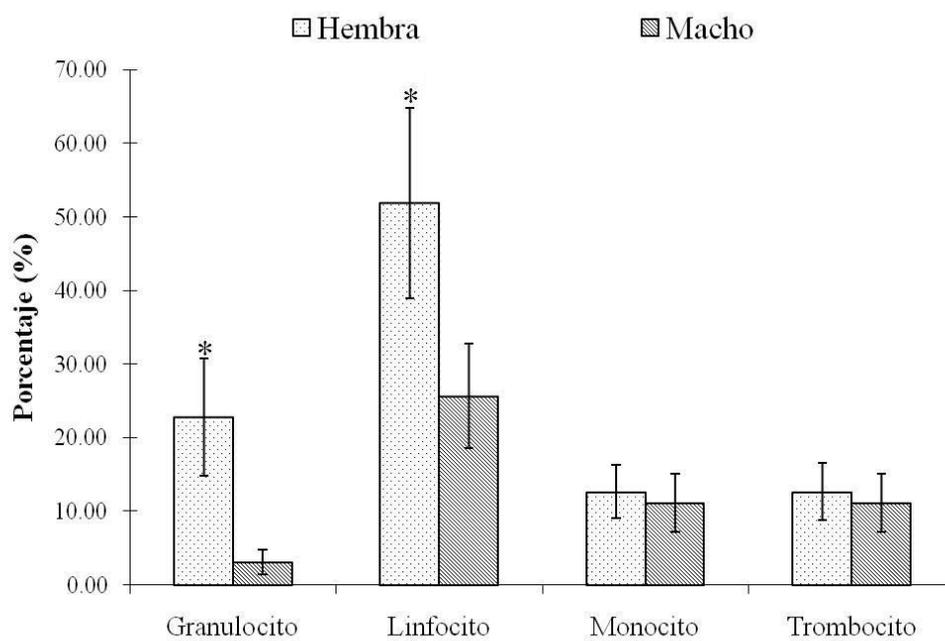
Los porcentajes de leucocitos y trombocitos presentes en sangre de hembras y machos inmaduros cautivos comprendieron un rango del 3 al 5% del total de células

presentes en sangre, muy similar a lo observado en los ejemplares maduros silvestres. Las hembras presentaron un mayor y significativo porcentaje de estas células (Fig. 34).



**Figura 34.** Porcentajes de leucocitos y trombocitos en hembras y machos inmaduros cautivos de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*. Asterisco señala una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

Dentro de los leucocitos, los linfocitos fueron las células blancas sanguíneas más representativas en ambos sexos, seguido de los granulocitos, pero sólo en hembras. En las hembras se observaron mayores y significativos porcentajes de linfocitos y granulocitos en comparación a los machos. Los porcentajes de monocitos y trombocitos entre ambos sexos no presentaron diferencias significativas (Fig. 35).



**Figura 35.** Perfil de leucocitos y trombocitos en hembras y machos cautivos e inmaduros de la cabrilla sardinera *Myxeroperca rosacea*. Asteriscos señalan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

## **7. DISCUSIÓN**

### ***7.1 Estatus de maduración en las hembras experimentales***

Se ha observado que hembras que se encuentran en los primeros estadios de desarrollo ovárico (pre-vitelogénesis y vitelogénesis) no logran la maduración final del ovocito (MFO) después de aplicarles un tratamiento hormonal (Myonas y Zohar 2001). Esto refleja la incapacidad de la glándula pituitaria en la liberación de cantidades apropiadas de LH, acorde con el estadio de desarrollo gonadal. Es por esto que fue fundamental el tener la certeza de que las hembras sujetas a un ensayo experimental en la inducción de la MFO se encontraran en una maduración vitelogénica avanzada.

La biopsia gonadal realizada en cada uno de los ejemplares capturados, en conjunto con las observaciones histológicas y las concentraciones de estradiol y testosterona estacionales, sustentaron el estatus de maduración avanzada en las hembras de cabrilla sardinera que fueron inducidas a la MFO en los cuatro tratamientos experimentales.

La presencia de ovocitos en diferentes estadios de maduración confirmó que el desarrollo gonadal así como la organización celular de las hembras de la cabrilla sardinera, ya descrita en trabajos previos elaborados por Kiewek-Martínez (2004) y Erisman y colaboradores (2007), se considera con una organización funcional del ovario de tipo asincrónico por grupo (Wallace y Selman 1981; De Vlaming 1983).

Es igualmente importante conocer otros aspectos como el estado de salud del pez, el estrés, y factores ambientales, dado que también juegan un papel importante en efectividad de los tratamientos hormonales (Berlinsky et al. 2005; Denson et al. 2007).

### ***7.2 Efecto de los tratamientos hormonales en el tamaño de ovocito en las hembras experimentales***

El tamaño inicial de los ovocitos vitelogénicos con alrededor de 450  $\mu\text{m}$  de diámetro, fue el adecuado para que en cualquiera de los cuatro tratamientos experimentales, potencialmente se indujera la ovulación, hidratación y desove en la cabrilla sardinera a través de un tratamiento exógeno hormonal. Lo anterior confirmó observaciones y metodologías utilizadas por Kiewek-Martínez y Gracia-López (2010) para inducir a la ovulación en esta

especie y en general para varias especies de teleósteos, en donde el tamaño del ovocito, obtenido a través de una biopsia ovárica, ya es una metodología probada (Weber et al 2000; Zohar y Mylonas 2001; Shiraishi et al. 2005; 2008; Mylonas y Zohar 2007; Zakêoe y Demska-Zakêoe 2009).

Los resultados mostraron que el mejor tratamiento para inducir la maduración final de los ovocitos en la cabrilla sardinera fue la administración de la hormona hCG, lo que concordó con lo reportado por Kiewek-Martínez y Gracia-López (2010) en esta especie. Con dicho tratamiento, se obtuvo un diámetro promedio de ovocitos alrededor de las 700  $\mu\text{m}$  a las 36 h, encontrándose cercanos al tamaño al momento de la ovulación que es de alrededor de 871 micras (Gracia-López et al. 2004). Generalmente, se aplica una segunda dosis para asegurar que el ovocito llegue a su tamaño máximo, lo cual no es una regla metodológica y depende del grado de maduración de cada hembra evaluada en el momento de la canulación. En este estudio, todas las hembras que se indujeron con hCG, se desovaron manualmente a las 48 h, sin la necesidad de una segunda dosis. Sin embargo, la viabilidad de los huevos en cuanto a su ovulación (migración y rompimiento de la vesícula germinal), seguido de la hidratación del huevo, requiere ser estudiada con más detalle en esta especie, dado que es común desovar manualmente los huevos y observar que no están hidratados, mostrando una flotabilidad negativa (huevos no viables), lo cual fue observado en todas las hembras experimentales tratadas con hCG.

### ***7.3 Efecto de los tratamientos hormonales en la síntesis de hormonas sexuales***

Los resultados mostraron que las concentraciones plasmáticas de  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) y testosterona (T) aumentaron significativamente y llegaron a un máximo después de 16 h, en respuesta a la inyección de la hormona hCG, la cual, también incrementó el tamaño de los ovocitos (ver inciso 7.2), mientras que las concentraciones de las hormonas LHRHa y GnRHa no tuvieron cambios significativos. Sin embargo, estas dos últimas, mostraron niveles de  $E_2$  y de T significativamente más altos en comparación al grupo de peces control placebo a las 36 h. Esto significa que el grupo control mostró una marcada disfunción reproductiva y sugiere entonces que las hormonas LHRHa y GnRHa, si bien no fueron exitosas, al menos sí contrarrestaron la interrupción de la MFO. Se sugiere entonces, que

los tratamientos hormonales de LHRHa y GnRHa, se deben de evaluar a dosis más altas, cuantificando a qué dosis ocurren los incrementos de los esteroides sexuales. Cabe resaltar el poco tiempo en el que comienza la disfunción reproductiva y lo necesario de realizar lo antes posible el tratamiento hormonal una vez que los peces han llegado al laboratorio.

El rápido incremento de  $E_2$  y T producidos en los ovocitos postvitelogénicos en respuesta a la administración de la hormona hCG, fue útil como un marcador predictivo, en donde el tratamiento a una dosis única de 1000 IU, respondió favorablemente a la MFO en la cabrilla sardinera, sin la necesidad de tener que esperar empíricamente el producto final, es decir, la ovulación y el desove manual 48 o 72 horas después. Los otros dos tratamientos hormonales, en cambio, hubieran podido ser reemplazados por otra hormona, o bien haberse incrementado o repetido en dosis a las 16 h, para ser evaluadas a las 36h. Es evidente que la cuantificación de esteroides sexuales contribuyó a tener un método simple de evaluación de la MFO mediante una toma de sangre, que permitirá evaluar la respuesta de inducción a las 16 h en investigaciones posteriores, después de la primera administración hormonal.

Estos resultados están de acuerdo con otros estudios en peces, en donde el rápido incremento de  $E_2$  y T, es útil como un marcador hormonal que predice que se alcanzará la ovulación y el desove. El efecto estimulador temprano de  $E_2$  y T se ha observado en aquellas especies de peces que desovan de una manera natural (sin la necesidad de inducción hormonal), como es el esturión Europeo *Acipenser sturio* (Davail-Cuisset et al. 2011), y la dorada *Sparus aurata* (Gothilf et al. 1997). Para aquellas especies de peces que sí requieren de una inducción hormonal, se ha observado que el rápido incremento de  $E_2$  y T, después de haberse administrado la primera dosis, indica que el tratamiento responderá favorablemente a la MFO, como se ha demostrado en estudios de peces marinos como el mojarrón *Morone saxatilis* (Mylonas et al. 1998), el jurel Japonés de cola amarilla *Seriola quinqueradiata* (Rahman et al. 2000), el pez globo *Takifugu rubripes* (Matsuyama et al. 2001), la lubina del Mediterráneo *Dicentrarchus labrax* (Prat et al. 2001), el esturión gigante *Huso huso*, el esturión Ruso *A. gueldenstaedtii*, el esturión estrellado *A. stellatus* (Barannikova et al. 2004), y el esturión Europeo *A. sturio* (Davail-Cuisset et al. 2011). En

peces dulce acuícolas como el pez gato Japonés *Silurus asotus*, en donde un incremento temprano de T es evidente después de 6 h de la administración de hCG (Miwa et al. 2001), la perca plateada *Bidyanus bidyanus* (Levavi-Sivan et al. 2004), la carpa común *Cyprinus carpio* (Levavi-Zermonsky y Yaron 1986), y la anguila de aleta larga *Anguilla dieffenbachia* (Lokman et al. 2001).

El incremento de T posterior a la inyección hormonal se debe a que la hCG estimula directamente a las células de la teca las cuales incrementan la producción de este esteroide sexual (Noori et al. 2010) y por tanto su conversión a E<sub>2</sub> vía aromatasas (Alvariño et al. 1992). Además, la cabrilla sardinera por tratarse de un pez con desarrollo gonadal asincrónico presenta ovocitos en diferentes estadios de maduración, por lo que un incremento de T y E<sub>2</sub> observado en sangre dentro del tiempo en que se producen los desoves, se debe a una actividad esteroideogénica propia de los folículos con ovocitos en plena vitelogénesis que se encuentran en la misma gónada (Pankhurst y Carragher 1992; Levavi-Sivan et al. 2004).

La eficacia de la hCG puede ser debido a que ésta hormona no requiere la existencia de LH almacenada o activación de los gonadotroforos de la pituitaria (Zohar y Mylonas 2001) y según estudios previos, las GtHs permanecen relativamente por más tiempo en circulación posterior al tratamiento (Ohta y Tanaka 1997). Esto no está relacionado con el hecho de que se trata de una hormona heteróloga para peces, dado que en humanos incluso tiene un periodo de vida más prolongado en circulación, comparado con las gonadotropinas de la pituitaria (Zohar y Mylonas 2001). Aunado a esto, la hCG presenta un alto grado de homogeneidad estructural (Ludwing et al. 2002) con una actividad similar a la gonadotropina LH, es decir actúa como una GtH endógena (Shiraishi et al. 2008). Ambas hormonas actúan a nivel de gónada, estimulan la síntesis de las hormonas inductoras a la MFO en las células foliculares, que son las que se encargan de inducir la hidratación de los ovocitos (Sullivan et al. 2003), e incluso inducen la sensibilidad de los ovocitos a las hormonas inductoras a la maduración (progesteronas) (Patiño y Thomas 1990; Shiraishi et al. 2005). Sin embargo, pese a su gran uso y bajo costo de producción, no siempre da buenos resultados pues se ha visto que no en todas las especies surte un efecto esperado,

además, debido a su condición heteróloga, se ha visto que cuando se aplica consecutivamente puede llegar a generar una inmunoresistencia, lo que significaría en un incremento de sus dosis de aplicación para que pueda hacer efecto e inducir el desove (Zohar y Mylonas 2001).

La hormona hCG, se prefiere por su efecto de inducción, pero también por la facilidad de conseguirla en México, su bajo costo y no tener que importar como en el caso de las hormonas LHRHa y GnRH. Tanto en hembras silvestres así como en cautivas maduras de cabrilla sardinera, se ha aplicado una dosis inicial de hCG de 1000 IU seguida de una segunda dosis de 500 IU posterior a las 24 h (dosis total, 1500 IU), la cual actúa como un agente efectivo para inducción al desove tanto para la cabrilla sardinera como para otros meros (Gracia-López et al. 2004), así como también ha sido exitosa para otras especies de teleósteos (Weber et al. 2000; Mylonas y Zohar 2001; El-Agamy et al. 2006; Shiraishi et al. 2008). Su rango de aplicación va de las 250 IU hasta las 4000 IU (Caylor et al. 1994; Emata et al. 1994; Zohar y Mylonas 2001).

El uso de LHRHa, conocida también como hormona luteinizante (Schally 1978), así como de la GnRHa (hormona liberadora de gonadotropinas análoga) inducen la MFO, la ovulación y el desove satisfactoriamente en una gran variedad de especies de teleósteos, ya sea solas o en complejo combinada (Thomas y Boyd 1988; Alvariño et al. 1992; Tan-Fermin et al. 1997; Duncan et al. 2003; Berlinsky et al. 2005; Firat et al. 2005; Cerqueira y Tsuzuki 2009; Mortezaavizadeh et al. 2010). Se ha observado que la hormona LHRHa tiene un efecto a partir de las 30-35 h posteriores a la administración de la misma (Thomas y Boyd 1988), aunque en otras especies la respuesta es posterior a las 40 h (Takushima et al. 2003) o posterior a una segunda dosis (Yang y Chen 2003).

La LHRHa y GnRHa son decapeptidos pequeños que no generan respuesta inmune y actúan al nivel más alto dentro del eje HPG proporcionando un mejor balance estimulador y al parecer una mejor integración de los eventos reproductivos con otras funciones fisiológicas, ya sea de manera directa o indirecta (Zohar y Mylonas 2001). Al tratarse de compuestos sintéticos, les permite permanecer por más tiempo en circulación gracias a su resistencia a las actividades enzimáticas, además presentan una alta afinidad a los receptores de membrana estimulando la síntesis de LH endógena en mayor grado que sus

formas nativas (Haddy y Pankhurts 2000; Zohar y Mylonas 2001). Se ha observado que estas neurohormonas presentan un mayor efecto estimulante cuando se combinan con otros compuestos, principalmente con inhibidores de dopamina que funciona como antagonista (Thomas y Boyd 1988; Tan-Fermin et al. 1997), ya que la introducción de hormonas exógenas provoca un incremento de dopamina inhibiendo los efectos de las mismas (Zohar y Mylonas 2001).

La baja eficacia en los niveles de los esteroides sexuales posterior a la inyección de LHRHa o GnRHa podría plantearse en primer instancia como un posible efecto retardante por parte de la dopamina (Prat et al. 2001; Zohar y Mylonas 2001) o bien una baja respuesta por parte de estas hormonas en la estimulación a la síntesis de GtHs y como consecuencia no hubo estimulación de las células de la teca para la producción de T y por tanto, una disminución de la actividad de la enzima aromataasa de las células de la granulosa (El-Agamy et al. 2006). Este mismo comportamiento de los esteroides se observó en trabajos realizados en *Engraulis ringens*, donde no se observaron cambios en sus niveles (Cisneros-Linares 2010; Espinoza et al. 2010).

Otro aspecto a considerar es la forma en que se administra la hormona, algunos reportes señalan que un sistema de liberación paulatina de neurohormonas análogas (implantes) mejora la cantidad y calidad de los huevos liberados en contraposición con aquellos obtenidos de manera espontánea o mediante inyecciones de GnRHa (Mylonas et al. 1996; Barbaro et al. 1997; Larsson et al. 1997; Mylonas y Zohar 2001; Duncan et al. 2003; Zakêoe y Demska-Zakêoe 2009). Finalmente, de acuerdo a datos obtenidos en otros teleósteos, existe una posible influencia de la hora del día sobre la respuesta de las GnRHs administradas, como se observó en *Dicentrarchus labrax*, donde fue a las 10 h que hubo un mayor porcentaje de hembras desovadas en contraposición con las inducidas a las 22 h (Alvariño et al. 1992) o bien, en función al mes dentro del período reproductivo, como se observó en “pez gato” *Clarias macrocephalus*, en el cual fue en los meses de mayo y agosto donde todas las hembras inyectadas ovularon mientras que en los meses de noviembre y febrero disminuyeron los desoves en un 80% y 60% respectivamente (Tan-Fermin et al. 1997).

El andrógeno 11-ketotestosterona (11-KT) en hembras de peces ha recibido poca atención, siendo en los machos donde se han realizado sus estudios y es debido a la relación del andrógeno con la espermiogénesis (Miura y Miura 2003). Asanuma y colaboradores (2003) señalan una posible relación entre el E<sub>2</sub> y la 11-KT en la síntesis de vitelogenina (VTG) en hembras de la anguila japonesa *Anguilla japonica*. Sugieren que no sólo los estrógenos, sino también los andrógenos puedan incrementar la producción de VTG durante el desarrollo gonadal en el hígado de machos y hembras, aunque el mecanismo a través del cual esto ocurre aún no está claro. Igualmente, se cree que juega un papel importante en el control del crecimiento de los ovocitos pre-vitelogénicos (Matsubara et al. 2003). Por otro lado, se han encontrado sitios de síntesis de la 11-KT en el ovario de algunas especies de la subfamilia Epinephelidae (Zhou y Gui 2008), por lo que podría ser una posible explicación a la presencia de este andrógeno en las hembras de la cabrilla sardinera en estadio reproductivo.

La hormona 11-KT fue analizada porque el proceso de diferenciación de la gónada en la cabrilla sardinera aún es polémico. El cambio secuencial de sexo de hembra a macho (hermafrodita protogínico) es común entre los meros de la familia Epinepheline. Sin embargo, de acuerdo con Erisman et al. (2008) la cabrilla sardinera presenta gonocorismo (sexos separados). Los niveles altos de 11-KT obtenidos en hembras maduras evidenciaron la plasticidad de cambio de sexo en esta especie. No obstante, las variaciones de esta hormona deben de ser investigadas tanto en hembras maduras e inmaduras silvestres, así como en ejemplares en cautiverio. Después de haber observado que esta hormona no tuvo cambios significativos durante los tratamientos experimentales, se puede concluir que no está relacionada con la MFO.

En la acuicultura de la cabrilla en el CIBNOR se tiene plena evidencia de que se trata de una especie hermafrodita protogínica, según las observaciones de Kiewek-Martínez (2004) e información reciente indica que los factores sociales, como es el que se encuentren machos aislados, dispara un mecanismo de reversión sexual de macho a hembra, lo que correspondería a un hermafrodita protándrico (D. Guerrero; *comm pers*). Cabe señalar que las observaciones de hermafroditismo se consideran que sea la causa más importante del

desfasamiento o desincronización en la maduración de hembras y machos en cautiverio y que ha evitado el control de la reproducción de esta especie en el CIBNOR. En otras especies de cabrillas hermafroditas, se ha reportado un incremento en los niveles de este andrógeno en sangre e incluso se ha detectado la presencia de  $E_2$  y T conforme sucede la reversión sexual (Zhou y Gui 2008).

Con lo anterior, se acepta la primera hipótesis de trabajo planteada, dado que los tres tratamientos hormonales tuvieron un efecto estimulador en la producción de esteroides sexuales en la cabrilla sardinera, siendo la hormona hCG la que presentó el mayor estímulo.

#### ***7.4 Efecto del cortisol en la maduración final de ovocitos en las hembras experimentales***

Los niveles de cortisol en este estudio se registraron elevados después de la captura y posteriormente, permanecieron sin cambios significativos a lo largo del tiempo experimental en los tres tratamientos hormonales y en el control placebo, a manera de un umbral de estrés. Como un dato adicional (D. Guerrero; *comm pers*), los niveles de cortisol que se han registrado en cabrillas inmaduras han sido similares a los registrados en este estudio. Esto sugiere, que el incremento de cortisol fue inducido por la captura y el manejo de transporte al laboratorio, lo que concuerda con lo reportado en la literatura de peces. Particularmente con el control placebo, la disminución significativa de esteroides sexuales pudiera estar ligada al efecto del cortisol elevado.

El no haber encontrado cambios significativos de cortisol en ninguno de los tratamientos hormonales, sugiere que éste metabolito no tuvo ningún efecto en la MFO. Sin embargo, no hay que descartar la posibilidad de que el umbral de estrés observado por la captura y transporte, pudiera haber ocultado un incremento significativo de este metabolito en alguno de los tratamientos hormonales experimentales, siempre y cuando los peces no hubieran estado estresados, que no fue el caso en este estudio. Para probar esta hipótesis, en investigaciones posteriores se tendrían que tener cabrillas maduras con bajos niveles de cortisol antes de administrar un tratamiento hormonal, para lo cual, se sugiere experimentar con hembras maduras en cautiverio. Sin embargo, previamente a la experimentación, se deberán establecer rangos que denoten un estrés y un cambio fisiológico, mientras que por

debajo de dicho rango, sean considerados como asintomáticos. En la literatura de peces, se considera que si la concentración de cortisol se encuentra por arriba de los 10 ng/mL, el pez estará estresado; sin embargo, esto varía en las diferentes especies (Pankhurst 2001) y habrá que investigarlo en la cabrilla sardinera.

No obstante, a nuestro conocimiento, este es el primer reporte de niveles de cortisol durante un tratamiento hormonal para inducir la MFO en hembras silvestres, y como una conclusión preliminar, tanto el manejo de reproductores así como la administración de hormonas, no implicaron un incremento adicional de estrés en la cabrilla sardinera, por lo que la segunda hipótesis de trabajo planteada se rechaza.

### ***7.5 Perfiles bioquímicos en las hembras experimentales inducidas a la maduración final de ovocitos***

Tanto en el medio silvestre así como en la acuicultura, la medición de niveles de parámetros bioquímicos como lípidos totales, triglicéridos, colesterol y glucosa han demostrado ser útiles en la determinación del estado de salud de los peces en confinamiento (Svoboda et al. 2001; Shi et al. 2006).

Se ha observado que una disminución en la concentración de lípidos totales en sangre está relacionada con actividades como la vitelogénesis, donde ésta molécula participa en la formación de la vitelogenina (Lund et al. 2000; Jensen y Taylor 2002). Asimismo, se ha observado en una gran variedad de teleósteos que niveles bajos de lípidos en plasma coinciden con los periodo de MFO y post-desove (Lund et al. 2000), como es el caso de *Fundulus heteroclitus* (Jensen y Taylor 2002).

Los triglicéridos son moléculas que al igual que los lípidos pueden variar en su concentración en sangre de acuerdo al género y juegan un papel importante en la regulación de la reproducción de muchos animales acuáticos (Lund et al. 2000; Tocher 2003; Glencross 2009). Los triglicéridos forman parte del vitelo y se han encontrado niveles altos en sangre durante la síntesis de vitelogenina dentro del periodo de predesove (Svoboda et al. 2001). Es en los huevos de los peces marinos donde son almacenados en gran proporción en forma de fosfoglicéridos y se cree que son la fuente principal para el

desarrollo visual y neural de la larva (Glencross 2009). Por otro lado, una disminución en los niveles de triglicéridos en plasma se ha observado por sobreactivación de la lipoproteína lipasa (LPL) en presencia de E<sub>2</sub> en plasma y la producción de nuevas células foliculares. El incremento en la actividad de la LPL es un mecanismo efectivo en la depositación de lípidos en el ovario y por tanto se reducen los niveles de triglicéridos en plasma (Jensen y Taylor 2002). Además, los triglicéridos son utilizados también como fuente de energía en algunos procesos metabólicos (Svoboda et al. 2001). También se ha observado que los triglicéridos juegan un papel importante en la función del sistema inmune en peces, como precursores en la producción de prostaglandinas por parte de los macrófagos así como en la síntesis de leucotrieno por parte de los neutrófilos en la respuesta inflamatoria (Glencross 2009).

El colesterol juega un papel importante en la esteroidogénesis ya que es la molécula base para la producción de los esteroides sexuales. Es extraído del interior de la membrana de las mitocondrias por la proteína reguladora esteroidogénica aguda (StAR, steroidogenic acute regulatory protein) y subsecuentemente es convertido a pregnenolona por acción del citocromo P450 (CYP 450 ssc) que a su vez es convertida a T a través de una serie de reacciones enzimáticas y posteriormente convertido en E<sub>2</sub> por acción de la aromatasa o en 11-KT por acción de la 11 $\beta$ -Hidroxiesteroide deshidrogenasa (11- $\beta$ HSD) (Denslow y Sepúlveda 2007; Arukwe 2008). El colesterol en plasma se ha observado disminuido en peces que han terminado la etapa reproductiva en el periodo de postdesove (Aras et al. 2008).

La valoración de los niveles de glucosa en sangre comúnmente se utiliza como indicador secundario de estrés en peces y una hiperglucemia se asocia con condiciones estresantes (Bayir et al. 2007). También se ha visto que de algún modo la glucosa forma parte del proceso de síntesis de vitelogenina (Sehgal y Goswami 2001). La glucosa es la fuente principal de energía para procesos bio-sintéticos y es evidente su disminución por manejo y confinamiento (Sehgal y Goswami 2001).

Los resultados bioquímicos mostraron una disminución significativa de niveles de lípidos totales, de triglicéridos y de glucosa ya sea a las 16 o 36 horas del tiempo

experimental, tanto en los tratamientos hormonales, así como en el control placebo, mientras que el colesterol se mantuvo sin cambios significativos. Esta disminución concuerda con estudios de ciclos reproductivos en peces, como es el caso de la trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* (Kocaman et al. 2005). El colesterol es base en la síntesis de corticoesteroides (Arukwe 2008), por lo que el nivel constante de colesterol observado concordó con el nivel constante cortisol (ver inciso 7.4).

A pesar de la gran importancia de todos los componentes bioquímicos analizados en este estudio, no se encontró ningún efecto en la MFO y ninguno de ellos resultó ser un marcador predictivo durante un tratamiento hormonal. Sin embargo, los resultados fueron los esperados por lo que la tercera hipótesis de trabajo planteada se acepta.

### ***7.6 Hematología en cabrilla sardinera silvestre y en cautiverio***

Dentro de los índices hematológicos, las células sanguíneas son de vital importancia en el sistema inmune y son un buen indicador de la salud en peces. El conteo diferencial de células sanguíneas puede indicar la presencia de una enfermedad infecciosa (Blaxhall and Daisley 1973) y provee datos para el estudio de mecanismos de defensa y la patogénesis de la enfermedad (Fijan 2002a, b). La hematología en el cultivo de peces marinos ha recibido poca atención para el diagnóstico de enfermedades y estado de salud en diferentes condiciones como reproducción, nutrición, medioambiente y densidad. Sin embargo, varios trabajos recientes en peces están surgiendo y contribuyendo a un mejor entendimiento de esta disciplina (Valenzuela et al. 1999; Fijan 2002a,b; Pavlidis et al. 2007; Zexia et al. 2007).

#### ***7.6.1 Descripción de células sanguíneas de cabrilla sardinera***

En este trabajo se identificaron diez tipos celulares, tres perteneciente al grupo de las células rojas (eritrocitos maduros, eritroblastos basófilos y los poli/ortocromáticos) y seis dentro del grupo de las células blancas (linfocitos, granulocitos [neutrófilos, basófilos y eosinófilos], monocitos y macrófagos) y uno relacionados con actividad coagulante, los trombocitos. Los resultados aquí obtenidos, en cuanto a la identificación de células sanguíneas presentes en la cabrilla sardinera, son consistentes con algunos trabajos

realizados en *Eleginops maclovinus* (Valenzuela et al. 1999), *Salminus maxillosus* (Veiga et al. 2000), entre otros. La presencia de macrófagos observados en hembras en el presente trabajo, contribuye al conocimiento de la hematología en peces teleósteos y muestra que los monocitos se convierten en macrófagos especializados circulantes en la sangre. La identificación y descripción de las células sanguíneas en la cabrilla sardinera dio pauta a poder discernir cuantitativamente si durante la reproducción de esta especie ocurre una inmunodepresión o bien una respuesta inmune y adicionalmente, comparar el estado de salud de hembras y machos en cautiverio. Por último, también permitió obtener información de eritropoiesis, hematocrito y conteo celular, tanto en cabrillas maduras capturadas en primavera, comparadas con cabrillas inmaduras en verano, así como cabrillas en cautiverio de ambos sexos.

#### 7.6.2 Eritropoiesis en cabrilla sardinera

Los resultados de eritropoiesis en la cabrilla sardinera concuerdan con lo reportado en la literatura de peces. La presencia de eritrocitos inmaduros en sangre circulante son señal de actividad eritropoiética; sin embargo, estas células sanguíneas son comúnmente encontradas en bajas proporciones en la sangre periférica de peces (Valenzuela et al. 2006). La eritropoiesis en peces, salvo en la trucha del Ártico *Salvelinus alpinus*, es activada cuando la demanda de oxígeno es superior al oxígeno suministrado. Esto está íntimamente relacionado con un incremento en la temperatura del agua y factores estacionales como la reproducción (Lecklin y Nikinmaa 1998). Además, dentro del rango normal de temperatura, hay una relación directa entre la temperatura ambiental y la capacidad de oxígeno en sangre (Soldatov 2005). En la lisa *Mugil cephalus*, la demanda metabólica aumenta durante la temporada de verano. Las lisas responden incrementando la eritropoiesis hasta que alcanza su pico máximo en la concentración de hematocrito y hemoglobina, que dura hasta que la especie migra a zonas más templadas dentro de sus áreas reproductivas en el Golfo de México (Cech y Wohlschlag 1982). La maduración sexual y el desove afectan la composición sanguínea de los peces. Se ha observado que hay una disminución de hematocrito (Ht), hemoglobina (Hb) y conteo de células rojas, y cuando la temporada

reproductiva finaliza, la sangre de los peces se regenera y recobra su capacidad oxigenativa mediante el incremento de la eritropoiesis (Soldatov 2005).

Los machos de cabrilla sardinera en cautiverio, mostraron un incremento significativo de eritroblastos, en comparación con las hembras. Está reportado que en los machos de la trucha café *Salmo trutta*, un incremento en plasma de 11-KT, durante la maduración espermatogénica coincide con un incremento en la actividad eritropoiética. Sin embargo, los machos de cabrilla en cautiverio estaban inmaduros y no fluyentes de esperma, por lo que esta diferencia entre los sexos, se puede interpretar como una mayor demanda de oxígeno de los machos en los tanques de cultivo. Sin embargo, se requiere de más investigación al respecto.

### 7.6.3 Hematocrito (Ht) y conteo de células sanguíneas en cabrilla sardinera

Los resultados del Ht en cabrilla sardinera concordaron con Filho et al. (1992) en especies de meros en Brasil, incluyendo *Epinephelus guaza* ( $35.7 \pm 5.5$ ), *Epinephelus niveatus* ( $33.9 \pm 8.3$ ), y *Mycteroperca tigris* ( $33.0 \pm 11.8$ ), los cuales estuvieron dentro del rango de la cabrilla sardinera madura e inmadura en México. Sin embargo, el conteo de células sanguíneas de las especies en Brasil sólo fueron similares a cabrillas maduras (*E. guaza*  $1.48 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ , *E. niveatus*  $1.64 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ , y *M. tigris*  $1.57 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ ), posiblemente porque dichas especies fueron capturadas durante la temporada reproductiva. El Ht y el conteo de células sanguíneas de cabrilla sardinera inmadura fueron significativamente mayores en comparación a las cabrillas maduras, lo cual correspondió a una mayor abundancia de eritroblastos.

Los niveles significativamente más bajos de Ht y conteo celular en los ejemplares maduros de la cabrilla sardinera puede ser un reflejo de una ligera anemia debida a la pérdida del apetito, ya que se ha observado que muchos peces se vuelven anoréxicos antes y durante el periodo de desove (Jobling 2000). Esto se ha observado en el salmón del Atlántico *Salmo salar* (Kadri et al. 1995; Simpson et al. 1996), la trucha *Salvelinus alpinus* (Tveiten et al. 1996), el bacalao *Gadus morhua* (Kjesbu et al. 1991; Fordham y Trippel 1999; Skjæraasen et al. 2005) y el lenguado de invierno *Pseudopleuronectes americanus*

(Bridges et al. 1976). Sala y colaboradores (2003) así como Erisman y colaboradores (2007) observaron las agregaciones que se forman de la cabrilla sardinera durante la temporada reproductiva y sugieren que los adultos reproductores se alimentan muy poco o se vuelven anoréxicos.

#### *7.6.4 Conteo diferencial de leucocitos en hembras y machos de cabrilla sardinera en cautiverio*

El sistema inmune innato es un mecanismo fundamental de defensa en los peces para combatir enfermedades (Magnadóttir 2006; Whyte 2007). La presencia de linfocitos en sangre de peces es común y suelen ser las células predominantes dentro de los leucocitos, lo que concordó con los resultados obtenidos en el presente trabajo. En el caso de las cabrillas mantenidas en cautiverio, las hembras presentaron una respuesta inmune mayor comparada con los machos, observándose un mayor porcentaje de linfocitos, seguido de granulocitos. De acuerdo a Ellis (1986), lo anterior sugiere que las hembras son más susceptibles a infecciones que los machos y por ende, están combatiendo una infección o un debilitamiento, hasta ahora no diagnosticado.

Es posible que los procesos de reversión sexual en la cabrilla sardinera, que fueron discutidos con anterioridad, den entrada a patógenos, debido al desbalance endocrino que representa, aunado quizás que las condiciones en cautiverio no sean las más adecuadas para la especie, puntos que ya se están investigando en las instalaciones acuícolas del CIBNOR.

La cantidad de linfocitos presentes en sangre en la literatura de peces es muy variable y dependen de factores como la especie, condiciones de extracción de la sangre y la condición fisiológica del pez (Fernández et al. 2002). Las citoquinas pro-inflamatorias son liberadas al torrente sanguíneo como parte de la respuesta inespecífica del sistema inmune en los peces y las quimioquinas producidas por los diferentes tipos celulares tienen, entre otras funciones, propiedades quimio-atrayentes estimulando el reclutamiento, activación y adhesión de las células a los sitios infectados o dañados (Whyte 2007). Estudios en otras especies han demostrado que los linfocitos de peces juegan un papel en la regulación de la respuesta temprana del sistema inmune a infecciones vía producción de quimioquinas

(Roca et al. 2007). La información disponible a cerca de los granulocitos es muy confusa (Zexia et al. 2007) dada la poca uniformidad de las técnicas de tinción utilizadas, la variedad morfológica de los granulocitos y la actitud antropogénica de los hematólogos (Valenzuela et al. 1999). Sin embargo, la descripción de los granulocitos de la cabrilla sardinera no mostró tener dicha ambigüedad en su identificación. Se sabe que los granulocitos son productores de lisozimas, una glucosidasa con actividad anti-bactericida y tiene la función de explosión respiratoria y fagocítica (Ainsworth 1992; Fernández et al. 2002) y puede desarrollar funciones adaptativas dentro de un microambiente tal como el tejido testicular del pez, el cual puede tener un inesperado papel aparte del de actuar como vigilante inmune (Chaves-Pozo et al. 2005).

#### *7.6.5 Conteo diferencial de leucocitos en hembras y machos de cabrilla sardinera silvestre*

La maduración de la cabrilla sardinera estuvo asociada con un incremento de leucocitos en sangre, mientras que en los machos se asoció sólo con un incremento de granulocitos y trombocitos. Por tanto, estos resultados están de acuerdo con aquellos estudios en peces en donde la leucofilia ocurre durante la temporada reproductiva y específicamente con el lenguado de invierno (Bridges et al. 1976) que es un pez marino. La respuesta inmune observada convergió con concentraciones elevadas en plasma de  $E_2$  y T, los cuales, al igual que los leucocitos, colapsaron en verano y que también están de acuerdo a lo publicado en peces en general (Janz 2000; Bridges et al. 1976).

##### *7.6.5.1 Linfocitos y trombocitos*

La proliferación de linfocitos y trombocitos en la cabrilla sardinera podría ser el resultado del incremento de  $E_2$  durante la maduración ovárica, lo cual está documentado en peces (Harris y Bird 2000). Por lo tanto, la linfofilia representaría el primer mecanismo de vigilancia inmune durante la maduración, y aparentemente, es seguido por una trombofilia, debida posiblemente a lesiones internas cuando los machos golpean el abdomen de una hembra durante el cortejo (Erisman et al. 2007).

#### 7.6.5.2 *Granulocitos y monocitos*

El radio más bajo y el radio más alto de granulocitos con respecto a monocitos (el tercer perfil  $\sim 0.2$ , y el segundo perfil  $\sim 1.7$ ) respectivamente, sugieren un incremento diferencial de estas células blancas en hembras maduras. Esto sugiere que después del incremento de linfocitos y trombocitos, al parecer ocurre un aumento de monocitos (monofilia), seguida de un aumento de granulocitos (granulofilia). Subsecuentemente, tanto granulocitos y monocitos llegan a un equilibrio en su abundancia en sangre circulante, resultando en el perfil de leucocitos más común con un radio alrededor de 0.5, dejando todos los tipos de células blancas con mayores porcentajes (leucofilia). Cabe señalar, que ninguno de los componentes bioquímicos y esteroideos analizados pudieron distinguir entre los tres tipos de leucogramas ya que no existieron diferencias significativas en todos los casos.

De acuerdo con las observaciones histológicas de hembras maduras este estudio, durante la temporada reproductiva, la gónada de la cabrilla sardinera desarrolla grupos asincrónicos de ovocitos que permiten múltiples desoves. Entre dos desoves, los folículos post ovulatorios se degradan y se regeneran. Esto significa que cualquier ovocito atrésico o folículo ovulado (cuerpo lúteo) debe de ser degradado mediante granulocitos y monocitos que se infiltran al ovario de la sangre periférica. La observación histológica de granulocitos y monocitos en vasos sanguíneos adyacentes a folículos post ovulatorios de cabrilla sardinera respalda el que este proceso de degradación ocurra. De hecho, en otras especies como el esparido *Lithognathus mormyrus* (Besseau y Faliex 1994) y en salmónidos (Bromage y Cumaranatunga 1988), este proceso de degradación es común y ocurre durante toda la vitelogénesis. En el caso de los machos de cabrilla sardinera, la granulofilia estaría involucrada en la continua fagocitosis de esperma residual o inviable, o bien, bacterias y parásitos en el líquido seminal, como ocurre también en *Lithognathus mormyrus* (Besseau y Faliex 1994).

Por otro lado, cuando la reproducción cesa, la gónada de la cabrilla sardinera se vuelve atrésica y se reabsorbe completamente, en donde sólo una cantidad muy pequeña de tejido ovárico se observa en el área urogenital. Por tanto, los granulocitos y los monocitos abundantes durante la temporada reproductiva también estarían involucrados en la

reabsorción de la gónada durante el período post desove. Existen estudios muy bien documentados en peces como el del esparido *Lithognathus mormyrus*, en donde los granulocitos y monocitos macrófagos se han identificado como muy abundantes cerca de los espermatozoides residuales y en áreas degeneradas de ovocitos durante el post-desove (Besseau y Faliex 1994). También se han encontrado centros de melano-macrófagos que están involucrados en la degradación de ovocitos atrésicos o bien, folículos no ovulados en la anguila pantanosa *Synbranchus marmoratus* (Ravaglia y Maggese 1995). Los monocitos son las principales células fagocitarias y son abundantes en tejidos inflamados ya que ingieren restos celulares resultantes de la respuesta inflamatoria (Fernández et al. 2002), por lo que su presencia en la sangre es preámbulo de una migración celular hacia el proceso inflamatorio que sufre la gónada durante la etapa reproductiva y post-reproductiva. En especies hermafroditas como la dorada *Sparus aurata*, abundan granulocitos fagocíticos durante la regresión testicular de esta especie (Chavez-Pozo et al. 2005).

Al revisar puntualmente algunos estudios en peces, en donde se indican los leucogramas de hembras maduras, resulta interesante evidenciar que la abundancia tanto de monocitos, así como de granulocitos, están involucrados en el proceso de maduración y desove, sin que esta información haya sido revisada con detalle, debido a que aún son pocos los estudios reportados. Un ejemplo se presenta en la carpa común *Rutilus rutilus*, en donde en una de las poblaciones silvestres analizadas, los granulocitos, monocitos y trombocitos fueron más abundantes en hembras maduras, mientras que en otra población silvestre y separada de la primera, nada se evidenció en la misma temporada reproductiva (Vainikka et al. 2004). En otro estudio reciente realizado en seis especies en cultivo procedentes del Mediterráneo, los porcentajes de los diferentes tipos de leucocitos no variaron de acuerdo al sexo de todas las especies que no estaban en reproducción (inmaduras). Sin embargo, en aquellas hembras de la especie besugo del Mar Blanco *Diplodus sargus* que se encontraban desovando, tuvieron una abundancia de neutrófilos (granulocitos) significativamente más alta que todas las demás especies inmaduras, así como una mayor abundancia, aunque no significativa, de monocitos (Pavdilis et al. 2007).

### 7.6.5.3 El papel de los leucocitos durante la maduración de la cabrilla sardinera

De acuerdo con Ellis (1986), un incremento de leucocitos en los peces puede representar una infección o debilitamiento establecido en el organismo, lo cual concuerda con lo observado en hembras en cautiverio de la cabrilla sardinera, en donde una linfocitosis y granulocitosis fueron evidentes. Sin embargo, durante la maduración ovárica de la cabrilla sardinera, la monocitosis y trombocitosis también estuvieron involucradas. En machos de la carpa *L. cephalus* la leucocitosis fue asociada con una diversidad más baja de parásitos durante el desove, comparado con antes y después de la reproducción (Rohlenová y Šimková 2010). Esto sugiere que durante la reproducción de la cabrilla sardinera, ocurre una respuesta inmune, tanto para una vigilancia inmunológica durante la maduración, asegurando el proceso reproductivo y la supervivencia del organismo, así como para la reabsorción de ovocitos atresados o en reabsorción en el intervalo entre dos desoves y en el post desove. Se hace notorio entonces, que es posible que exista una coordinación endocrina-inmune que asegura el éxito de la reproducción en esta especie. Esta interpretación de los resultados, contradice la interpretación sugerida por Bridges et al. (1976) en el lenguado de invierno, en donde la leucocitosis ocurre por un aumento de estrés y de una mayor susceptibilidad a infecciones durante la reproducción y que es basada y tipificada en los salmónidos. En caso de haber un agente infeccioso, el sistema inmune está en “alerta” y combate y disminuye dicha infección como el caso de la carpa *L. cephalus*, expuesto anteriormente (Rohlenová and Šimková 2010). Sobre la base de esta interpretación, la cuarta hipótesis de trabajo planteada es rechazada dado que no se evidenció una inmunodepresión durante la maduración de la cabrilla sardinera.

Con lo anterior, se sugiere que después de un desove, las quimoquinas atrayentes liberadas por el ovario reclutan leucocitos de sangre periférica para infiltrarse en vasos sanguíneos ováricos para mantener una actividad inmune de vigilancia y fagocitosis, mientras que el mecanismo de retroalimentación endocrina, produce hormonas esteroideas sexuales y vitelogenina para preparar el próximo grupo de ovocitos para alcanzar la maduración final.

Hay evidencia de expresión genética de ARN mensajero y el péptido de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH-I) en linfocitos del la curvina roja *Sciaenops ocellatus* (Mohamed y Kan 2006), que también sugiere que los linfocitos, aparte de vigilancia, contribuyan a la síntesis de gonadotropinas para la maduración de la gónada.

Por último, se puede mencionar que ya que existe evidencia de que los granulocitos y los monocitos intervienen en la reabsorción de la gónada durante el post desove, y en la regresión de la gónada en peces protándricos, el papel de estos glóbulos blancos durante la maduración de peces requiere mayor investigación.

## 8. CONCLUSIONES

1. El mejor tratamiento para inducir a la maduración final de ovocitos de la cabrilla sardinera fue utilizando la hormona hCG. Dicho tratamiento mostró un efecto estimulador significativo en la síntesis de los esteroides sexuales de E<sub>2</sub> y T, más no de 11-KT.
2. Las inducciones hormonales de GnRHa y LHRHa no mostraron un efecto estimulador en la síntesis de los esteroides sexuales, más sin embargo, contrarrestaron la disfunción reproductiva, como fue observada en las hembras del grupo control placebo, por lo que no se descarta su uso para inducciones posteriores.
3. Se contribuyó con un método simple de evaluación de la maduración final de ovocitos, mediante una toma de sangre, que permitirá predecir la respuesta de inducción a las 16 h después de la inyección, a través de la cuantificación de esteroides sexuales.
4. La concentración del andrógeno 11-KT puede ser un buen indicador de monitoreo en reversiones sexuales de forma protogónica o protándrica que ocurran en cautiverio.
5. El nivel de cortisol elevado fue consecuencia de la captura y transporte. No se encontró evidencia de que el nivel de cortisol se incrementara por efecto de los tratamientos hormonales.
6. La disminución de lípidos totales, triglicéridos y glucosa fue debida a la utilización metabólica de estos componentes por manejo y confinamiento. Los niveles de colesterol se mantuvieron constantes. Ninguno de los componentes bioquímicos analizados resultó ser un marcador predictivo durante un tratamiento hormonal.
7. Los niveles bajos de hematocrito y conteo bajo de células rojas en los ejemplares reproductivos de la cabrilla sardinera puede ser un reflejo de una ligera anemia debida a la pérdida del apetito durante la reproducción.
8. Un incremento en las células leucocíticas o leucofilia en hembras maduras podría representar una coordinación endocrina-inmune para la reabsorción de gametos no utilizados y tejido gonadal durante la reproducción y el periodo post reproductivo,

mientras que los esteroides sexuales y la vitelogénesis preparan el siguiente grupo de ovocitos para su maduración, o bien atresian la gónada.

9. La presencia de monocitos y granulocitos en hembras maduras se relacionó a su actividad fagocítica y anti-inflamatoria ya que son abundantes en tejidos inflamados y se sugiere que su incremento se manifiesta de una manera diferencial durante la reproducción.

## **9. RECOMENDACIONES**

1. Se sugiere evaluar los efectos de fotoperiodo y temperatura en la estimulación de esteroides sexuales para inducir a la maduración en cautiverio y al inducir a la maduración final de ovocitos.
2. Se sugiere que los tratamientos hormonales de LHRHa y GnRHa, se deben de evaluar a dosis más altas, cuantificando a qué dosis ocurren los incrementos de los esteroides sexuales.
3. Se sugiere investigar las variaciones de 11-Ketotestosterona tanto en hembras maduras e inmaduras silvestres, así como en ejemplares en cautiverio.
4. Se sugiere investigar las variaciones de cortisol en cabrillas en proceso de maduración en cautiverio.
5. Se sugiere investigar las variaciones de eritropoiesis de cabrillas en cautiverio.
6. Se sugiere comparar información hemática de cabrillas en diferentes sistemas de confinamiento para su reproducción.
7. Se sugiere continuar evaluando los porcentajes de células blancas en ovario y testículo con respecto a la sangre periférica de ejemplares maduros.

## 10. LITERATURA CITADA

- Abreu, J.S., L.S. Takahashi, M.A. Hoshiba y E.C. Urbinati.** 2009. Biological indicators of stress in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after capture. *Braz. J. Biol.* 69(2): 415-421
- Acerete, L., S. MacKenzie y L. Tort.** 2005. Cortisol: funcions i importància del receptor glucocorticoide. Una visió comparada. *Treballs de la SCB.* 56:165-174
- Ainsworth, A. J.** 1992. *Fish granulocytes: morphology, distribution and function.* **En:** Faisal, M. y F.M. Hetrick (eds). Annual Review of Fish Diseases, Vol. 2. New York: Pergamon Press. 123–148 pp
- Alcorn, S.W., A.L. Murray y R.J. Pascho.** 2002. Effects of rearing temperature on immune functions in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Fish Shellfish Immunol.* 12(4): 303-334
- Alvariño, J.M.R., S. Zanuy, F. Prat, M. Carrillo y E. Mañanos.** 1992. Stimulation of ovulation and steroids secretion by LHRHa injection in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of time of day. *Aquaculture.* 102: 177-186
- Andrade, A.** 2006. *Metodologías en el laboratorio clínico: El Inmunoensayo. Capítulo 53.* **En:** Arce, V.M., P.F. Catalina y F. Mallo (eds.). Endocrinología. Ed. Univ. Santiago de Compostela.
- Anver, C.E.** 2004. Blood chemistry (electrolytes, lipoprotein and enzymes) values of black scorpion fish (*Scorpaena porcus*, 1758) in the Dardanelles, Turkey. *J. Biol. Sci.* 4: 716–719.
- Aras, M., A. Bayir, A.N. Sirkecioglu, H. Polat y M. Bayir.** 2008. Seasonal variations in serum lipids, lipoproteins and some haematological parameters of chub (*Leuciscus cephalus*). *Ital. J. Anim. Sci.* 7: 439-448

- Arends, R.J., J.M. Mancera, J.L. Muñoz y S.E. Wendelaar Bonga.** 1999. The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *J. Endocrinol.* 163: 149–157
- Arukwe, A.** 2008. Steroidogenic acute regulatory (StAR) protein and cholesterol side-chain cleavage (P450<sub>scc</sub>)-regulated steroidogenesis as an organ-specific molecular and cellular target for endocrine disrupting chemicals in fish. *Cell Biol. Toxicol.* 24:527–540
- Asadi, F., M. Masoudifard, A. Vajhi, K. Lee, M. Pourkabir y P. Khazraeinia.** 2006. Serum biochemical parameters of *Acipenser persicus*. *Fish Physiol. Biochem.* 32: 34-47
- Asanuma, H., H. Ohashi, H. Matsubara, S. Ijiri, T. Matsubara, T. Todo, S. Adachi y K. Yamauchi.** 2003. 11-ketotestosterone potentiates estrogen-induced vitellogenin production in liver of Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Fish Physiol. Biochem.* 28: 383–384
- Babin, P.J., O. Carnevali, E. Lubzens, y W.J. Schneider.** 2007. *Molecular aspects of oocyte vitellogenesis in fish.* **En:** Babin, P.J., J. Cerdà y E. Lubzens. The Fish Oocyte from basic studies to Biotechnological applications. Springer. 39-76
- Bahmani, M., R. Kazemi y P. Donskaya.** 2001. A comparative study of some hematological features in young reared sturgeons (*Acipenser persicus* and *Huso huso*). *Fish Physiol. Biochem.* 24:135–140
- Barannikova, I.A., L.V. Bayunova y T.B. Semenкова.** 2004. Serum levels of testosterone, 11-ketotestosterone and oestradiol-17 $\beta$  in three species of sturgeon during gonadal development and final maturation induced by hormonal treatment. *J. Fish Biol.* 64: 1330-1338
- Barbaro, A., A. Francescon, G. Bozzato, A. Merlin, P. Belvedere y L. Colombo.** 1997. Induction of spawning in gilthead seabream, *Sparus aurata* L., by a long-acting

- GnRH agonist and its effects on egg quality and daily timing of spawning. *Aquaculture*. 154: 349-359
- Barton, B.A.** 2002. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integ. Comp. Biol.* 42(3): 517-525
- Barton, B.A y G.K. Iwama.** 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann. Rev. Fish Diseases* 1: 3-26.
- Bastardo, A. y R. Díaz Barberán.** 2005. Parámetros hematológicos de la paragua, *Chaetodipterus faber* (Broussonet) (Pices: Ehippidae), en condiciones de cultivo. *Zootecnia Trop.* 22(4): 361-370
- Bayir, A., A.N. Sirkecioğlu, H. Polat y N.M. Aras.** 2007. Biochemical profile of blood serum of siraz *Capoeta capoeta umbla*. *Comp. Clin. Pathol.* 16:119–126
- Bayir, A., A.N. Sirkecioğlu, H. Polat y N.M. Aras.** 2007. Biochemical profile of blood serum of siraz *Capoeta capoeta umbla*. *Comp. Clin. Pathol.* 16:119–126
- Benfet, T.J. y A.M. Sutterlin.** 1984. Growth and gonadal development in triploid landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can J. Fish Aquat. Sci.* 41:1387–1392
- Berlinsky, D.L., W. King V y T.I.J. Smith.** 2005. The use of luteinizing hormone releasing hormone analogue for ovulation induction in black sea bass (*Centropristis striata*). *Aquaculture*. 250(3-4): 813-822
- Bernstein, R.M., S.F. Schluter, y J.J. Marchalonis.** 1998. *Immunity. En:* Evans, D.H. (Ed.). The Physiology of fishes. 2a Ed. CRC Press. E.U.A. 215-242
- Besseau, L. y E. Faliex.** 1994. Resorption of unemitted gametes in *Lithognathus mormyrus* (Sparidae, Teleostei): a possible synergic action of somatic and immune cells. *Cell Tissue Res.* 276(1):123-132

- Blaxhall**, P.C. y K.W. Diasley. 1973. Routine Haematological methods for use with fish blood. *J. Fish Biol.* 5: 771-781
- Bowden**, T.J. 2008. Modulation of the immune system of fish by their environment. *Fish Shellfish Immunology.* 24(4): 373-383
- Bridges**, D.W., J.J. Cech y D.N. Pedro. 1976. Seasonal Hematological Changes in Winter Flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Trans. Am. Fish. Soc.* 105(5): 596-600
- Bromage**, N.R. y R. Cumarantunga. 1988. *Egg production in the rainbow trout*. **En:** Muir, J.F. y R. Roberts (eds.). *Recent Advances in Aquaculture*. London and Sydney: Croom Helm. 63-138 pp.
- Brown-Peterson**, N., P. Thomas y C.R. Arnold. 1988. Reproductive biology of the spotted seatrout *Cynoscion nebulosus* in south Texas. *Fishery Bull.* 86(2): 373-388.
- Campbell**, M.D. 2008. Characterization of the stress response of red snapper: Connecting individual responses to population dynamics. PhD Thesis. Texas Tech University. USA. 111 pp.
- Caylor**, R.E., P.M. Biesiot y J.S. Franks. 1994. Culture of cobia (*Rachycentron canadum*) cryopreservation of sperm and induced spawning. *Aquaculture.* 125: 81-92
- Cech**, J.J.Jr y D.E. Wohlschlag. 1982. Seasonal patterns of respiration, gill ventilation, and hematological characteristics in the striped mullet, *Mugil cephalus*. *Bull. Mar. Sci.* 32(1):130-138
- Cerqueira**, V. R. y M. Y. Tsuzuki. 2009. A review of spawning induction, larviculture, and juvenile rearing of the fat snook, *Centropomus parallelus*. *Fish Physiol. Biochem.* 35: 17-28
- Chaves-Pozo**, E., P. Castillo-Briceño, A. García-Alcázar, J. Meseguer, V. Mulero y A. García-Ayala. 2008. A role for matrix metalloproteinases in granulocyte infiltration and testicular remodeling in a seasonal breeding teleost. *Molecular Immunology* 45: 2820–2830

- Cisneros-Linares, P.B.** 2010. Efecto de la inyección de un análogo de GnRH sobre la maduración final ovocitaria y los perfiles plasmáticos de esteroides gonadales en anchoveta peruana (*Engraulis rigens*). Tesis Lic. Biología. Univ. Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. 50 pp
- Clearwater, S.J.** y N.W. Pankhurst. 1997. The response to capture and confinement stress of plasma cortisol, plasma sex steroids and vitellogenic oocytes in the marine teleosts, red gurnard. *J. Fish Biol.* 50: 429-441
- Collazos, M. E., E. Ortega, C. Barriga y A.B. Rodríguez.** 1998. Seasonal variation in haematological parameters in male and female *Tinca tinca*. *Mol. Cel. Biochem.* 183: 165-168
- Conroy, D.** y G. Armas. 1984. Estudios hematológicos en las lisas sudamericanas (mugilidae). *Mems. Asoc. Latinoam. Acuicultura, Maracay.* 5(3): 553-562
- Cuesta, A., L. Vargas-Chacoff, A. García-López, F.J. Arjona, G. Martínez-Rodríguez, J. Meseguer, J.M. Mancera y M.A. Esteban.** 2007. Effect of sex-steroid hormones, testosterone and estradiol, on humoral immune parameters of gilthead seabream. *Fish Shellfish Immunology.* 23: 693-700
- Davail-Cuisset, B., T. Rouault y, P. Williot.** 2011. Estradiol, testosterone, 11-ketotestosterone, 17, 20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one and vitellogenin plasma levels in females of captive European sturgeon, *Acipenser sturio*. *J. Appl. Ichthyol.* 27(2): 666-672
- Davidov, O, L. Kurovskaya, I. Balakhnin y P. Shevchuk.** 2002. Physiological express methods in Diagnostic of fish diseases. *J. Hydrobiol.* 38(1):65-76.
- Dawson, A.** 1998. Comparative reproductive physiology of non-mammalian species. *Pure Appl. Chem.* 70(9): 1657-1669.
- De Pedro, N. A.I. Guijarro, M.A. López-Patiño, R. Martínez-Álvarez y M.J. Delgado.** 2005. Daily and seasonal variations in haematological and blood biochemical

parameters in the tench, *Tinca tinca* Linnaeus, 1758. *Aquaculture Research*. 36: 1185-1196

**De Vlaming, V.** 1983. *Oocyte development patterns and hormonal involvements among teleosts*. **En:** Rankin, J.C., T.J. Pithcer y R.T. Duggan (eds.). Control processes in fish physiology. Wiley-Interscience. U.S.A. 176-199

**Denslow, N.** y M. Sepúlveda. 2007. *Ecotoxicological effects of endocrine disrupting compounds on fish reproduction*. **En:** Babin, P.J., J. Cerdà y E. Lubzens. The Fish Oocyte from basic studies to Biotechnological applications. Springer. 255-322

**Denson, M.R.,** W.E. Jenkins, D.L. Berlinsky y T.I.J. Smith. 2007. A comparison of human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone releasing hormone analogue for ovulation induction in black sea bass *Centropristis stiata* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture Research*. 38: 918-925

**Díaz-Uribe, J.G.,** J.F. Elorduy-Garay y M.T. González-Valdovinos. 2001. Age and growth of the leopard grouper *Mycteroperca rosacea* in the southern Gulf of California, Mexico. *Pacific Science*. 55: 171-182

**Donaldson, E.M.** 1990. Reproductive indices as measures of the effects of environmental stressors in fish. *American Fisheries Society Symposium* 8: 109-122

**Duncan, N.J.,** G.A. Rodriguez M. de O., D. Alok y Y. Zohar. 2003. Effects of controlled delivery and acute injection of LHRHa on bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus*) spawning. *Aquaculture*. 218: 625-635

**Dye, H.M.,** J.P. Sumpter, U.H.M. Fagerlund y E.M. Donaldson. 1986. Changes in reproductive parameters during the spawning migration of pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum). *J. Fish Biol.* 29: 167-176

**Ekström, P.** y H. Meissl. 1997. The pineal organ of teleosts fish. *Review Fish Biol. Fisheries* 7, 199–284

- El-Agamy, A.E;** M.M. El-Gharabawy, N.A. Ebraheem, S.S. Assem y A.F. Fahmy. 2006. Effect of hormonal injection on concentration of sex steroid hormones and fine structure of ova in female *Chrysichthys rueppelli* during spawning season. *Egyptian J. Aquatic Research*. 32(1): 431-449
- Ellis, A.E.** 1986. The function of teleost fish lymphocytes in relation to inflammation. *Int. J. Tissue React.* 8(4): 263–270
- Emata, A.C.,** B. Eullaran y T.U. Bagarino. 1994. Induced spawning and early life description of the mangrove red snapper *Lutjanus argentimaculatus*. *Aquaculture*. 121: 381-387
- Erisman, B.E.,** M.L. Buckhorn y P.A. Hasting. 2007. Spawning patterns in the leopard grouper, *Mycteroperca rosacea*, in comparison with other aggregating groupers. *Mar. Biol.* 151:1849–1861
- Erisman, B.E.,** J.A. Rosales-Casián y P.A. Hastings. 2008. Evidence of gonochorism in a grouper, *Mycteroperca rosacea*, from the Gulf of California, Mexico. *Environ. Biol. Fish.* 82: 23-33
- Espinoza, C.,** A. Perea, B. Buitrón, P. Cisneros, Ch. Catcoparco, A. Alberro y D. Vizziano. 2010. Inducción del desove y espermiación de anchoveta peruana *Engraulis ringens* (Jenyns, 1842) en cautiverio mediante la inyección de un análogo de GnRH. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 38(2): 234-241
- Esteban, M.A.,** A. Rodríguez, A. García Ayala y J. Meseguer. 2004. Effects of high doses of cortisol on innate cellular immune response of seabrea (*Sparus aurata* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.* 137: 89-98
- Fast, M.D.,** S. Hosoya, S.C. Johnson y L.O.B. Afonso. 2008. Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short- and long-term stress. *Fish Shellfish Immunol.* 24: 194-204

- Fernández, A.B.,** I. de Blas e I. Ruiz. 2002. El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos. *Revista Aquatic*. 16. URL: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=146>
- Fijan, N.** 2002a. Morphogenesis of blood cell lineages in channel catfish. *J. Fish Biol.* 60(4): 999-1014
- Fijan, N.** 2002b. Composition of main haematopoietic compartments in normal and bleed channel catfish. *J. Fish Biol.* 60:1142–1154
- Filho, D.W.,** G.J. Eble, G. Kassner, F.X. Caprario, A.L. Dafré y M. Ohira. 1992. Comparative hematology in marine fish. *Comp. Biochem. Phys.* 102(2): 311-321
- Firat, K.,** S. Saka y C. Süzer. 2005. Gonadal oocyte development in LHRHa hormone treated European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) broodstock. *Turk J. Vet Anim Sci.* 29: 83-87
- Fischer, W.,** F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K.E. Carpenter y V.H. Niem. 1995. *Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico Centro-Oriental.* Vol. III. Vertebrados (2). Roma, FAO. 1201-1813.
- Fordham, S.E.** y E.A. Trippel. 1999. Feeding behavior of cod (*Gadus morhua*) in relation to spawning. *J. Appl. Ichthyol.* 15(1):1-9.
- Fostier, A.,** R. Billard, B. Breton and Y. Zohar. 1983. *The gonadal steroids.* **En:** Hoar, W.S., D.J. Randall y E.M. Donaldson (eds). *Fish Physiology* Vol. 9A. Academic Press. U.S.A. 277-372
- Fordham, S.E.** y E.A. Trippel. 1999. Feeding behavior of cod (*Gadus morhua*) in relation to spawning. *J. Applied Ichthyol.* 15(1):1-9
- Glencross, B.D.** 2009. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Reviews in Aquaculture.* 1: 71–124

- Goetz, F.W.** 1983. *Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fish*. **En:** Hoar, W.S., Randall, D.J. y Donaldson, E.M. (eds.). *Fish Physiology*. Vol. IX, Part B: Reproduction. Academic Press, Orlando, Florida, pp. 117–170
- González, A.** y F. Piferrer. 2003. Aromatase activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 132: 223-230
- Gothilf, Y., I. Meiri, A. Elizur, y Y. Zohar.** 1997. Preovulatory changes in the levels of three gonadotropin releasing hormone-encoding messenger ribonucleic acids mRNAs gonadotropin h-subunit mRNAs, plasma gonadotropin, and steroids in the female gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Biol. Reprod.* 57, 1145– 1154
- Gracia-López, V., J. Rodríguez-Romero y J.M. Pérez-Ramírez.** 2004a. Inducción al desove con hCG y desarrollo embrionario y de larvas de la cabrilla sardinera, *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877). *Ciencias Marinas.* 30(2): 279-284
- Gracia-López, V., M. Kiewek-Martínez, M. Maldonado-García.** 2004b. Effects of temperature and salinity on artificially reproduced eggs and larvae of leopard grouper *Mycteroperca rosacea*. *Aquaculture.* 237 (1-4): 485-498
- Gracia-López, V., M. Kiewek-Martínez, M. Maldonado-García, P. Monsalvo-Spencer, G. Portillo-Clark, R. Civera-Cerecedo, M. Linares-Aranda, M. Robles-Mungaray y J.M. Mazon-Suastegui.** 2005. Larvae and juvenile production of the leopard grouper, *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877) *Aquaculture Research.* 36(1): 110-112
- Habibi, H.R. y C.V. Andreau-Vieyra.** 2007. *Hormonal regulation of follicular atresia in teleost fish*. **En:** Babin, P.J., J. Cerdà y E. Lubzens. *The Fish Oocyte from basic studies to Biotechnological applications*. Springer. 235

- Haddy**, J.A. y N.W. Pankhurst. 2000. The efficacy of exogenous hormones in stimulating changes in plasma steroids and ovulation in wild black bream *Acanthopagrus butcheri* is improved by treatment at capture. *Aquaculture*. 191: 351–366
- Hara**, A., C.V. Sullivan y W.W. Dickhoff. 1993. Isolation and some characterization of vitellogenin and its related egg yolk proteins from coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Zool. Sci.* 10(2): 245-256
- Harding**, J. y L. Hoglund. 1983. On accuracy in estimating fish blood variables. *Comp. Biochem. Physiol.* 75 A: 35-40
- Harris**, J. y D.J. Bird. 2000. Modulation of the fish immune system by hormones. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 77: 163-176
- Hazon**, N. y R.J. Balment. 1998. *Endocrinology*. **En:** Evans, D.H. (Ed.). The Physiology of fishes. 2a Ed. CRC Press. E.U.A. 441-463 pp.
- Hellqvist**, A., M. Schmitz, I. Mayer y B. Borg. 2006. Seasonal changes in expression of LH- and FSH- in male and female three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 145: 263–269
- Hesser**, E. F. 1960. Methods for Routine Fish Hematology. *Prog. Fish-Culturist.* 22(4): 164-171
- Hine**, P.M. 1992. The granulocytes of fish. *Fish Shellfish Immunol.* 2: 79-88.
- Hoar**, W.S. 1969. *Reproduction*. **En:** Hoar, W.S. y D.J. Randall (Eds.). 1969. Fish Physiology. Vol. III. Academic press. E.U.A. 1-72 pp.
- Hobby**, A.C. y Pankhurst, N.W. 1997. The relationship between plasma and ovarian levels of gonadal steroids in the repeat spawning marine fishes *Pagrus auratus* (Sparidae) and *Chromis dispilus* (Pomacentridae). *Fish Physiol. Biochem.* 16: 65–75.

- Hobby, A.C., N. W. Pankhurst y D. P. Geraghty.** 2000. A comparison of sex steroid binding protein (SBP) in four species of teleost fish. *Fish Physiol. Biochem.* 23: 245–256
- Hou, Y., Suzuki, Y., Aida, K.,** 1999. Effects of steroid hormones on IgM in rainbow trout. *Fish Physiol. Biochem.* 20(2): 155-162
- Houillon, C.** 1972. *Sexualidad.* Omega. Barcelona, España. 201 pp.
- Houssay, B.A.** 1930. Acción sexual de la hipófisis en los peces y reptiles. *Rev. Soc. Arg. Biol.* 106 : 686–688.
- Humanson, G.L.** 1972. *Animal Tissue Techniques.* 3a Ed. W.H. Freeman and Company. San Francisco. USA.
- Iwama, G.K., P.T. Thomas, R.B. Forsyth y M.M. Vijayan.** 1998. Heat shock protein expression in fish. *Reviews Fish Biol. Fisher.* 8: 35-56
- Janz, D.M.** 2000. *Endocrine System.* **En:** Ostrander, GK (Ed). The Handbook of Experimental Animals: The Laboratory Fish. Academic Press, London. 189-212. doi:10.1006/bklf.2000
- Jaramillo-Schadebrodt, N.** 2005. Estudio hematológico básico del puye (*Galaxias maculatus*) (Jenyns, 1842) en estado postlarval y adulto. Tesis Lic. Univ. Cat. Temuco. Chile. 86 pp
- Jensen, B.H. y M.H. Taylor.** 2002. Lipid transport in female *Fundulus heteroclitus* during the reproductive season. *Fish Physiol. Biochem.* 25: 141–151
- Jobling, M.** 2000. *Feeding and nutrition in intensive fish farming.* **En:** Black K.D. y A.D. Pickering (ed.). Biology of Farmed Fish. Sheffield Academic Press Sheffield, England. 67-113 pp.
- Jobling, M.** 1995. *Environmental Biology of Fishes.* Chapman & Hall. Gran Bretaña. 455 pp

- Kadri, S., N.B. Metcalfe, F.A. Huntingford y J.E. Thorpe.** 1995. What controls the onset of anorexia in maturing adult female Atlantic salmon? *Funct. Ecol.* 9(5):790-797
- Kah, O., C. Lethimonier, G. Somoza, L.G. Guilgur, C. Vaillant y J.J. Lareyre.** 2007. GnRH and GnRH receptors in metazoa: A historical, comparative, and evolutive perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.* 153: 346-364
- Katz, M.** 1951. The Number of Erythrocytes in the Blood of the Silver Salmon. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 80(1): 184-193.
- Kiewek-Martinez, N.M.** 2004. Contribución al conocimiento de la reproducción en cautiverio de la cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea*. Maestría. CIBNOR. México. 93 pp.
- Kiewek-Martinez, N.M.** 2009. 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. Doctorado. CIBNOR. México.
- Kiewek-Martinez, M. y V. Gracia-López.** 2010. Comparison of the Effects of HCG and LHRHa on the Induction of Ovulation of Wild and Captive Leopard Grouper, *Mycteroperca rosacea*. *J. World Aqua. Soc.* 41(5): 733-745
- Kjesbu, O.S., J. Klungsøyr, H. Kryvi, P.R. Witthames y M. Greer Walker.** 1991. Fecundity, atresia, and egg size of captive Atlantic cod (*Gadus morhua*) in relation to proximate body composition. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48(12):2333-2343.
- Kocaman, E.M., T. Yanik, O. Erdoğan y A.K. Çiltaş.** 2005. Alterations in cholesterol, glucose and triglyceride levels in reproduction of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Anim. Vet. Adv.* 4:801-804
- Kokokiris, L. B. Mourot, F. Le Menn, M. Kentouri y A. Fostier.** 2000. Endocrine changes during the annual reproductive cycle of the red porgy *Pagrus pagrus* (Teleostei, Sparidae). *Fish Physiol. Biochem.* 23: 1-11

- Lagler, K.F., J.E. Bardach, R.R. Miller y D.R. May Passino.** 1990. *Ictiología*. AGT Editor. DF, México. 489 pp
- Lai, Y.S., S. Murali, H.C. Chiu, H.Y. Ju, Y.S. Lin, S.C. Chen, I.C. Guo, K. Fang y C.Y. Chang.** 2001. Propagation of yellow grouper nervous necrosis virus (YGNNV) in a new nodavirus-susceptible cell line from yellow grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel), brain tissue. *J. Fish Dis.* 24: 299–309
- Lam, T.J.** 1982. Application of endocrinology in fish culture. *Can. J. Aquat. Fish. Sci.* 39: 11-137
- Larsson, J., C.C. Mylonas, Y. Zohar, L.W. Crim.** 1997. Gonadotropin-releasing hormone analogue GnRH-a induces multiple ovulations of high-quality eggs in a cold-water batch-spawning teleost, the yellowtail flounder *Pleuronectes ferrugineus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54: 1957-1964
- Lecklin, T. y M. Nikinmaa.** 1998. Erythropoiesis in Arctic char is not stimulated by anaemia. *J. Fish Biol.* 53(6):1169-1177.
- Leeson, T.S., C.R. Leeson y A.A. Paparo.** 1990. *Texto/Atlas de Histología*. Interamericana-McGraw-Hill. Mexico. 195-233 pp
- Lequin, R.M.** 2005. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA). *Clinical Chemistry.* 51(12): 2415–2418
- Levavi-Sivan, B., R. Vaiman, O. Sachs y I. Tzchori.** 2004. Spawning induction and hormonal levels during final oocyte maturation in the silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture.* 229: 419-431
- Levavi-Zermonskey, B. y Z. Yaron.** 1986. Changes in gonadotropin and ovarian steroids associated with oocyte maturation during spawning induction in the carp. *Gen. Comp. Endocrinol.* 62: 89-98.
- Lokman, P.M., R.T. Wass, H.C. Suter, S.G. Scott, K.F. Judge y G. Young.** 2001. Changes in steroid hormone profiles and ovarian histology during salmon pituitary-induced

vitellogenesis and ovulation in female New Zealand longfinned eels, *Anguilla dieffenbachii* Gray. *J. Exp. Zool.* 289:119-129

**Lomonte, B.** 2003. *Nociones de Inmunología*. 3ª Ed. Universidad de Costa Rica. 45 pp.  
<http://www.icp.ucr.ac.cr/~blomonte/index.html>

**Ludwig, M., R.E. Felberbaum, K. Diedrich y B. Lunenfeld.** 2002. Ovarian stimulation: from basic science to clinical application. *Rep. BioMed. Online.* 5(1): 73-86

**Lund, E.D., C.V. Sullivan y A.R. Place.** 2000. Annual cycle of plasma lipids in captive reared striped bass: effects of environmental conditions and reproductive cycle. *Fish Physiol. Biochem.* 22: 263–275

**Lutz, C.G.** 2001. *Control and Induction of Maturation and Spawning*. **En:** Lutz, C.G. (ed). Practical Genetics for Aquaculture. Fishing News Books, Blackwell Science, Oxford, 174-217 pp.

**Magnadóttir, B.** 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.* 20: 137-151

**Makarananda, K. y G.E. Neal.** 1992. *Chapter 29 Competitive ELISA*. **En:** Manson, M (ed.). Methods in Molecular Biology, VoL 10: Immunochemical Protocols. The Humana Press. USA. 267-272

**Mao, X.L., S. Zhou, D. Xu, J. Gong, H.C. Cui y Q.W. Quin.** 2008. Rapid and sensitive detection of Singapore grouper iridovirus by loop-mediated isothermal amplification. *J. Appl. Microbiol.* 105: 389–397

**Martinez-Lagos, R. y V. Gracia-Lopez.** 2009. Morphological development and growth patterns of the leopard grouper *Mycteroperca rosacea* during larval development. *Aquaculture Research.* 1-9

**Mathews, C.K. y K.E. Van Holde.** 1998. *Bioquímica*. McGraw-Hill-Interamericana. España. 1283 pp.

- Matsubara, M.,** P.M. Lokman, A. Senaha, Y. Kazeto, S. Ijiri, A. Kambegawa, T. Hirai, G. Young, T. Todo, S. Adachi y K. Yamauchi. 2003. Synthesis and possible function of 11-ketotestosterone during oogenesis in eel (*Anguilla* spp.). *Fish Physiol. Biochem.* 28: 353–354
- Matsuyama, M.,** Adachi, S., Nagahama, Y., Kitajima, C., y Matsuura, S. 1991. Annual reproductive cycle of the captive female Japanese sardine *Sardinops melanostictus*: relationship to ovarian development and serum levels of gonadal steroid hormones. *Mar. Biol.* 108: 21-29
- Matsuyama, M.,** A. Sasaki, K. Nakagawa, T. Kobayashi, Y. Nagahama y H. Chuda. 2001. Maturation-inducing hormone of the tiger puffer, *Takifugu rubripes* (Tetraodontidae, Teleostei): biosynthesis of steroids by the ovaries and the relative effectiveness of steroid metabolites for germinal vesicle breakdown in vitro. *Zool. Sci.* 18:225-234
- Miura, T.** y C.I. Miura. 2003. Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 181–186
- Miwa, T.,** G. Yoshizaki, H. Naka, M. Nakatani, K. Sakai, M. Kobayashi y T. Takeuchi. 2001. Ovarian steroid synthesis during oocyte maturation and ovulation in Japanese catfish (*Silurus asotus*). *Aquaculture.* 179-191
- Mohamed, J.S.** y I.A Kan. 2006. Molecular cloning and differential expression of three GnRH mRNAs in discrete brain areas and lymphocytes in red drum. *J. Endocrinol.* 188: 407-416
- Mommsen, T.P.,** M.M. Vijayan y T.W. Moon. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fisheries.* 9: 211-268
- Mortezavizadeh, S.A.,** M.Y. Feshalami y F.B. Kahkesh. 2010. Effect of GnRH $\alpha$ (D-Ala $_6$ ,des-Gly $_{10}$  mGnRH $\alpha$ ), LHRH-a(des-Gly $_{10}$ , [D-Ala $_6$ ]LH-RH Ethylamid) and

- Carp pituitary in artificial propagation of gattan *Barbus xanthopetrus* (heckle 1843). *Worlds J. Fish Mar. Sci.* 2(4): 280-284
- Mumford, S.** 2009. Histology of finfish. **En:** Heil, N. (Ed). National Wild Health Fish Survey, Laboratory Procedures Manual, 5.0 Ed., U.S. Fish and Wildlife Service, Warm Springs, GA.
- Muñoz-Cueto, J.A.** 2005. *Control Hormonal de la Reproducción en Peces.* **En:** Silva, A. (Ed.) Cultivo de Peces Marinos. Universidad Católica del Norte. Coquimbo. Chile. 266 págs. ISBN: 956-287-211-4. 101-158 pp.
- Mylonas, C.C., Y. Magnus, A. Gissis, Y. Klebanov y Y. Zohar.** 1996. Application of controlled-release, GnRHa-delivery systems in commercial production of white bass striped bass hybrids sunshine bass, using captive broodstocks. *Aquaculture.* 140: 265-280.
- Mylonas, C.C., L. Curry Woods III, P. Thomas y Y. Zohar.** 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. y Y. Zohar.** 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries.* 10: 463–491
- Mylonas, C.C. y Y. Zohar.** 2007. *Promoting oocyte maturation, ovulation and spawning in farmed fish.* Cap. 15. **En:** Babin, P.J., J. Cerdà y E. Lubzens. The Fish Oocyte from basic studies to Biotechnological applications. Springer. 437-474
- Nagahama, Y. y M. Yamashita.** 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Develop. Growth Differ.* 50: S195–S219
- Nagasawa, K y E.R. Cruz-Lacierda.** 2004. Diseases of cultured groupers. Southeast Asian Fisheries Development Center, Aquaculture Department, Iloilo, Philippines

- Nagler, J.J.** y D.R. Idler. 1990. Ovarian uptake of vitellogenesis and another high-density lipoprotein in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and their relationship to yolk proteins. *Biochem. Cell. Biol.* 68: 330-335
- Najiah, M., M. Nadirah, H. Marina, S.W. Lee y W.H. Nazaha.** 2008. Quantitative Comparisons of Erythrocyte Morphology in Healthy Freshwater Fish Species from Malaysia. *Research J. Fish. Hydrobiol.* 3(1): 32-35
- Nandi, J.** 1967. Comparative endocrinology of steroid hormones in vertebrates. *Am. Zoologist.* 7: 115-133
- Ng, T.B.** y D.R. Idler. 1983. *Yolk formation and differentiation in teleost fishes.* **En:** Hoar, W.S., D.J. Randall y E.M. Donaldson (eds). Fish Physiology Vol. 9A. Academic Press. E.U.A. 373-404
- Noori, A., B.M. Amiri, A. Mirvaghefi y D.W. Baker.** 2010. LHRHa-induced ovulation of the endangered-Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) and its effect on egg quality and two sex steroids: testosterone and 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone. *Aquaculture Research.* 41:871-877
- Norris, D. O.** 1980. *Vertebrate Endocrinology.* 3<sup>a</sup> Ed. Academic Press. E.U.A. 634 pp.
- Ohta, H.** y H. Tanaka. 1997. Relationship between serum levels of human chorionic gonadotropin (hCG) and 11-ketotestosterone after a single injection of hCG and induced maturity in the male Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture.* 153. 123-134
- Okubo, K.** y K. Aida. 2003. GnRH gene products downregulate their neighboring genes encoding protein tyrosine phosphatases. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 23–24
- Olabuenaga, S.E.** 2000. Sistema inmune en peces. *Gayana (Concepcion)* 64(2): 205-215
- Palíková, M., J. Mares y J. Jirásek.** 1999. Characteristics of leukocytes and thrombocytes of selected sturgeon species from intensive breeding. *Acta Vet. Brno.* 68: 259–264

- Pankhurst, N.W.** 2001. Stress inhibition of reproductive endocrine processes in a natural population of the spiny damselfish *Acanthochromis polyacanthus*. *Marine Freshwater Research*. 52(5): 753-761
- Pankhurst, N.W.** y J.F.Carragher. 1992. Oocyte maturation and changes in plasma steroid levels in snapper *Pagrus* (= *Chrysophrys*) *auratus* (Sparidae) following treatment with human chorionic gonadotropin. *Aquaculture* 101: 337-347
- Parhar, I.S.** 2003. Gonadotropin-releasing hormone receptors: neuroendocrine regulators and neuromodulators. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 13-18
- Patiño, R.** y P.Thomas. 1990. Effects of gonadotropin on ovarian intrafollicular processes during the development of oocyte maturational competence in a teleost, the Atlantic croaker: evidence for two distinct stages of gonadotropic control of final oocyte maturation. *Biol. Rep.* 43: 818-827
- Pavlidis, M., W. C. Futter, P. Katharios y P. Divanach.** 2007. Blood cell profile of six Mediterranean mariculture fish species. *J. Appl. Ichthyol.* 23: 70-73.
- Pears, Rachel J.** 2005. *Comparative demography and assemblage structure of serranid fishes: implications for conservation and fisheries management*. PhD thesis, James Cook University. 212 pp.
- Peleteiro, M.C** y R.H. Richards. 1990. Phagocytic cells in the epidermis of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.* 13(3): 225-232
- Peter, R.E.** 1983. *The Brain and Neurohormones in teleost reproduction*. **En:** Hoar, W.S., D.J. Randall and E.M. Donaldson (Eds.). *Fish Physiology* Vol. 9A. Academic Press. E.U.A. 97-135
- Peter, R.E., H.R. Lin y Van der Kraak.** 1988. Induced ovulation and spawning in cultured freshwater fish in China: advances in application of GnRH analogous and dopamine antagonist. *Aquaculture*. 74: 1-10

- Peter**, R.E. y K.L. Yu. 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. *Reviews Fish Biol. Fisheries*. **7**: 173–197
- Peutz**, IL.J.A., R.W.A. Oorschot, G.R Johnson, B.S. Horney y J.H. Boon. 1996. The leucogram as an indicator of marine-cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Waibaum), health in The Netherlands. *Aquaculture Research*.**27**: 437-445
- Pierson**, P.M., A. Lamers, G. Flik, N. Mayer-Gostan. 2004. The stress axis, stanniocalcin, and ion balance in rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol*. **137**:263–271
- Piferrer**, F. y M. Blázquez. 2005. Aromatase distribution and regulation in fish. *Fish. Physiol. Biochem*. **31**: 215-226
- Prat**, F.; S. Zanuy y M. Carrillo. 2001. Effect of gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRHa) and pimozone on plasma levels of sex steroids and ovarian development in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*. **198**: 325-338
- Rahman**, M.A., K. Ohta, H. Chuda, S. Nakano, K.Maruyama y M. Matsuyama. 2000. Gonadotropin-induced steroidogenic shift towards maturation-inducing hormone in Japanese yellowtail during final oocyte maturation. *J. Fish. Biol*. **58**: 462-474
- Ravaglia**, M.A. y M.C. Maggese. 1995. Melano-macrophage centres in the gonads of the swamp eel, *Synbranchus marmoratus* Bloch, (Pisces, Synbranchidae): histological and histochemical characterization. *J. Fish Dis*. **18**(2):117-125.
- Redding**, J.M. y R. Patiño. 1993. *Reproductive Physiology*. **En**: Evans, D.H (ed). The Physiology of Fishes. U.S.A.
- Roca**, F.J., M.L.Cayuela, C.J. Secombes, J. Meseguer y V. Mulero. 2007. Posttranscriptional regulation of cytokine genes in fish: A role for conserved AU-rich elements located in the 3'-untranslated region of their mRNAs. *Mol. Immunol*. **44**: 472–478.

- Rohlenová, K.** y **A. Šimková.** 2010. Are the immunocompetence and the presence of metazoan parasites in cyprinid fish affected by reproductive efforts of cyprinid Fish? *J. Biomed. Biotech.* doi:10.1155/2010/418382
- Rotllant, J., R. J. Arends, J. M. Mancera, G. Flik, S.E. Wendelaar Bonga y L. Tort.** 2000. Inhibition of HPI axis response to stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) with physiological plasma levels of cortisol. *Fish Physiol. Biochem.* 23: 13–22
- Rottmann, R.W., J.V. Shireman y F.A. Chapman.** 1991. *Introduction to Hormone-Induced Spawning of Fish.* SRAC Publication No. 421
- Sala, E, O. Aburto-Oropeza, G. Paredes y G. Thompson.** 2003. Spawning aggregations and reproductive behavior of reef fishes in the Gulf of California. *Bull Mar Sci* 72:103–121
- Sala E, O. Aburto-Oropeza, M. Reza, G. Paredes y L.G. López-Lemus.** 2004. Fishing down coastal food webs in the Gulf of California. *Fisheries* 29(3):19–25
- Sarasquette, M.** 1984. Variación anual de los parámetros hematológicos del pez sapo marino, *Halobatrachus didactylus*. *Inv. Pesq.* 48(3):399-417
- Satchell, G.** 1991. *Physiology and form of fish circulation.* Ed. Cambridge Univ. Press. Australia. 235 pp
- Schally, A.V.** 1978. Aspects of hypothalamic regulation of the pituitary gland. *Science.* 202: 18-28
- Schreck, C.B., W. Contreras-Sanchez y M.S. Fitzpatrick.** 2001. Effects of stress in fish reproduction, gamete quality and progeny. *Aquaculture.* 197: 3-24
- Schulz, R.W. y T. Miura.** 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiol. Biochem.* 26: 43–56
- Sehgal, N. y S.V. Goswami.** 2001. Biochemical changes in the liver of the Indian freshwater murrel, *Channa punctatus* (Bloch) during estradiol-induced vitellogenin synthesis. *Fish Physiol. Biochem.* 24: 149–155

- Selyes, H.** 1956. *The stress of life*. McGraw-Hill. USA. 324 pp.
- Sherwood, N., L. Eiden, M. Brownstein, J. Spiess, J. Rivier y W. Vale.** 1983. Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 2794-2798
- Shi, X., D. Li, P. Zhuang, F. Nie1 y L. Long.** 2006. Comparative blood biochemistry of Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii*, and Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*. *Fish Physiol. Biochem.* 32:63–66
- Shiraishi, T., S.D. Ketkar, H. Kitano, M. Nyuji, A. Yamaguchi y M. Matsuyama.** 2008. Time course of final oocyte maturation and ovulation in chub mackerel *Scomber japonicus* induced by hCG and GnRHa. *Fish. Sci.* 74: 764-769
- Shiraishi, T., K. Ohta, A. Yamaguchi, M. Yoda, H. Chuda y M. Matsuyama.** 2005. Reproductive parameters of the chub mackerel *Scomber japonicus* estimated from human chorionic gonadotropin-induced final oocyte maturation and ovulation in captivity. *Fisheries Science.* 71: 531-542
- Silkin, Y.A. y E. N. Silkina.** 2005. Effect of Hypoxia on Physiological Biochemical Blood Parameters in Some Marine Fish. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 41(5): 527—532
- Silveira R., Y. Vinjoy y A. Prieto.** 1996. Los análisis hematológicos como sistemas de diagnostico en *Oreochromis aureus* de cultivo en Cuba. *Rev. Lat. Acuicult.* 36: 4-6
- Simpson, A.L., N.B. Metcalfe, F.A. Huntingford, J.E. Thorpe.** 1996. Pronounced seasonal differences in appetite of Atlantic salmon parr, *Salmo salar*: effects of nutritional state and life-history strategy. *Funct. Ecol.* 10(6):760-767.
- Skjæraasen, J.E., A.G. Salvanes, Ø. Karlsen. R. Dahle, T. Nilsen, B. Norberg.** 2005. Influence of photoperiod on maturation and energy allocation in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Fish Physiol. Biochem.* 30:163-174.

- Slater**, C.H., C.B. Schreck y P. Swanson. 1994. Plasma profiles of the steroids and gonadotropins in maturing female spring Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Comp. Biochem. Physiol.* 109 A(1): 167-175
- Soldatov**, A. 2005. Peculiarities of Organization and Functioning of the Fish Red Blood System. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 41(3): 272-281
- Somoza**, G.M., L.A. Miranda, P. Strobl-Mazzulla y L.G. Guilgur. 2002. Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) from fish to mammalian brains. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22(5/6): 589-609
- Sullivan**, C.V., N. Hiramatsu, A.M. Kennedy, R.W. Clark. 2003. Induced maturation and spawning: opportunities and applications for research on oogenesis. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 481-486
- Suwa**, k. y M. Yamashita. 2007. *Regulatory mechanisms of oocyte maturation and ovulation. En:* Babin, P.J., J. Cerdà y E. Lubzens. The Fish Oocyte from basic studies to Biotechnological applications. Springer. 232-347 pp
- Svoboda**, M., J. Kouřh, J. Hamáčková, P. Kaláb, L. Savina, Z. Svobodová y B. Vykusová. 2001. Biochemical profile of blood plasma of tench (*Tinca tinca* L.) during pre-and postspawning period. *Acta Vet. Brno.* 70:259–268
- Swanson**, P., T.J. Dickey y B. Campbell. 2003. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 53–59
- Takatsuki**, A. e I. Yamaguchi. 2001. Fish reproduction as an indicator of endocrine disruption by chemical compounds. *RIKEN Review.* 42: 43-44
- Takemura**, A. y M. Oka. 1998. Immunochemical sexing of living yellow fin tuna, *Thunnus albacares* (Bonnaterre), using a vitellogenin-like protein. *Aquaculture Research.* 29: 245-249

- Takushima, M., R. Nozaki, K. Kadomura, S. Yasumoto y K. Soyano.** 2003. Induced ovulation using LHRHa and artificial fertilization in devil stinger *Inimicus japonicas*. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 521–522
- Tan-Fermin, J.D., R.R. Pagador y R.C. Chavez.** 1997. LHRHa and pimozide-induced spawning of Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Gunther) at different times during an annual reproductive cycle. *Aquaculture.* 148: 323-331
- Tavares-Dias, M.** 2006. A morphological and cytochemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts. *J. Fish Biol.* 68: 1822-1833
- Terasawa, F., M. Kitamura, A. Fujimoto y S.I. Hayama.** 2002. Changes of blood composition in captive bottlenose dolphins. *J. Vet. Med. Sci.* 64(1): 1075-1078
- Thomas, P. y N. Boyd.** 1988. Induced spawning of spotted seatrout, red drum and orange mouth corvina (Family: Sciaenidae) with Luteinizing hormone-releasing hormone analog injection. *Cont. Mar. Scien.* 30: 43-48
- Thomas, P., Y. Zhu y M. Pace.** 2002. Progesterin membrane receptors involved in the meiotic maturation of teleost oocytes: a review with some new findings. *Steroids* 67, 511–517
- Thomas, P.** 2003. Rapid, nongenomic steroid actions initiated at the cell surface: lessons from studies with fish. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 3–12
- Tocher, D.R.** 2003. Metabolism and function of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews Fish. Sci.* 11(2): 107-184
- Tort, L., J.C. Balasch y S. Mackenzie.** 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología.* 22 (3): 277-286
- Tort, L., J.C. Balasch y S. Mackenzie.** 2004. Fish health challenge after stress. Indicators of immunocompetence. *Contribution to Science*, 2 (4): 443–454

- Tveiten, H., H.K. Johnsen y M. Jobling.** 1996. Influence of maturity status on the annual cycles of feeding and growth in Arctic char reared at constant temperature. *J. Fish Biol.* 48(5): 910-924.
- Tyler, J.R. and Sumpter, J.P.** 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Rev. Fish Biol. Fish.* 6: 287-318
- Vainikka, A., E.Jokinen, R. Kortet y J. Taskinen.** 2004. Gender- and seasondependent relationships between testosterone, oestradiol and immune functions in wild roach. *J. Fish Biol.* 64(1): 227-240.
- Valenzuela, A., V. Silva y C. Oyarzún.** 1999. Caracterización cualitativa y cuantitativa de células sanguíneas de robalo *Eleginops maclovinus* (Valenciennes, 1830) (Pisces, Eleginopsidae) en la desembocadura del río Biobío. *Rev. Biol. Mar. Ocean.* 34 (2): 261-267
- Valenzuela, A.E., V.M. Silva y A.E. Klempau.** 2006. Qualitative and quantitative effects of constant light photoperiod on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) peripheral blood erythrocytes. *Aquaculture.* 251 (2-4):596-602
- Valenzuela, A.E., V.M. Silva y A.E. Klempau.** 2007. Some changes in the haematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to three artificial photoperiod regimes. *Fish Physiol. Biochem.* 33: 35-48
- Van der Kraak, J., P. Chang y D.M. Janz.** 1998. *Reproduction. En:* Evans, D.H. (Ed.). The Physiology of fishes. 2a Ed. CRC Press. E.U.A. 465-488 pp.
- Van Weemen, B.K. y A.H.W.M. Schuurs.** 1971. Immunoassay using antigen-enzyme conjugate. *FEBS Letters.* 15(3): 232-236
- Veiga, M.L., M.I. Egami, M.J.T. Ranzani-Paiva y E.L. Rodríguez.** 2000. Aspectos morfológicos y citoquímicos de las células sanguíneas de *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840 (Characiformes, Characidae). *Rev. Chil. Anat.* 18 (2) Temuco.

- Verburg-van Kemenade, L.** y C. Schreck. 2007. Immune and endocrine interactions. *Gen. Comp. Endocrinol.* 152: 352
- Voronina, E.** y Gary M. Wessel. 2003. The Regulation of Oocyte Maturation. *Current Topics Development. Biol.* 58: 53-110
- Wallace, R.A.** y K. Selman. 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Amer. Zool.* 21:325-343
- Weber, G.M.,** W. King V, R.W. Clark, R.G. Hodson y C.V. Sullivan. 2000. Morphophysiological predictors of ovulatory success in captive striped bass (*Morone saxatilis*). *Aquaculture.* 188: 133-146
- Whyte, S.K.** 2007. The innate immune response of finfish -A review of current knowledge. *Fish Shellfish Immunol.* 23: 1127-1151
- Yang, Z.** y Y-F Chen. 2003. Induced ovulation using LHRHa in anadromous obscure puffer *Takifugu obscurus* cultured entirely in freshwater. *Fish Physiol. Biochem.* 29: 323-326
- Yaron, Zvi.** 1995. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture.* 129: 49-73
- Zakêoe, Z.** y K. Demska-Zakêoe. 2009. Controlled reproduction of pikeperch *Sander lucioperca* (L.): a review. *Arch. Pol. Fish.* 17: 153-170
- Zanuy, S.M.** y F. Carrillo. 1987. *La reproducción de los teleósteos y su aplicación en acuicultura.* **En:** Espinosa de los Monteros, J. y U. Labarta. (eds.). 1987. Reproducción en acuicultura. FEUGA. España. 1-132 pp.
- Zexia, G.,** W. Weimin, Y. Yi, K. Abbas, L. Dapeng, Z. Guiwei y J.S. Diana. 2007. Morphological studies of peripheral blood cells of the Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*. *Fish Physiol. Biochem.* 33:213–222

- Zhou, L.** y J.F. Gui. 2008. Molecular mechanisms underlying sex change in hermaphroditic groupers. *Fish Physiol Biochem.* DOI 10.1007/s10695-008-9219-0
- Zhou, X., M. Li, K. Abbas y W. Wang.** 2009. Comparison of haematology and serum biochemistry of cultured and wild Dojo loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Fish Physiol. Biochem.* 35:435–441.
- Zohar, Y.** y C.C. Mylonas, 2001. Endocrine manipulation of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture.* 197: 99-135.

## ANEXO I

Rutina de tinción para Hematoxilina-Eosina de Harris.

<b>Paso</b>	<b>Solución</b>
1	Xilol 100%
2	Xilol-Etanol 1:1
3	Etanol 70%
4	Etanol 96%
5	H <sub>2</sub> O
6	Hematoxilina de Harris
7	H <sub>2</sub> O
8	Etanol-ácido 1:100
9	H <sub>2</sub> O
10	H <sub>2</sub> O-amoniaco 1:500
11	H <sub>2</sub> O
12	Etanol 50%
13	Etanol 70%
14	Eosina azulosa alcohólica
15	Etanol 96%
16	Etanol 100%
17	Xilol 100%
18	Montaje en Resina o entellan

## ANEXO II

Tablas con niveles de Testosterona, 17 $\beta$ -estradiol, 11-Ketotestosterona y Cortisol (ng/mL) en plasma de cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* (Media  $\pm$  Desviación estándar) en los diferentes tratamientos hormonales. El tiempo 0 representa antes de la inyección.

<b>Testosterona</b>				
<b>Tiempo</b>	<b>Placebo</b>	<b>LHRHa</b>	<b>GnRHa</b>	<b>hCG</b>
<b>0 h</b>	14.5 $\pm$ 0.8	16.5 $\pm$ 0.8	15.8 $\pm$ 0.4	16.0 $\pm$ 0.5
<b>16 h</b>	12.6 $\pm$ 0.4	15.0 $\pm$ 0.9	13.6 $\pm$ 0.9	18.8 $\pm$ 0.4
<b>36 h</b>	13.0 $\pm$ 0.2	15.5 $\pm$ 1.4	15.3 $\pm$ 0.9	19.0 $\pm$ 1.0
<b>17<math>\beta</math>-estradiol</b>				
<b>0 h</b>	9.5 $\pm$ 0.8	10.4 $\pm$ 0.4	10.7 $\pm$ 0.2	11.9 $\pm$ 1.3
<b>16 h</b>	5.0 $\pm$ 0.4	9.6 $\pm$ 0.6	6.8 $\pm$ 1.3	20.0 $\pm$ 0.8
<b>36 h</b>	5.5 $\pm$ 0.2	9.0 $\pm$ 1.0	9.2 $\pm$ 1.0	21.0 $\pm$ 1.0
<b>11-Ketotestosterona</b>				
<b>0 h</b>	13.9 $\pm$ 0.3	14.2 $\pm$ 0.2	14.3 $\pm$ 0.2	14.7 $\pm$ 0.3
<b>16 h</b>	13.8 $\pm$ 0.4	14.0 $\pm$ 0.4	14.4 $\pm$ 0.3	14.5 $\pm$ 0.3
<b>36 h</b>	14.2 $\pm$ 0.4	14.4 $\pm$ 0.3	14.7 $\pm$ 0.4	14.8 $\pm$ 0.4
<b>Cortisol</b>				
<b>0 h</b>	22.6 $\pm$ 0.9	22.3 $\pm$ 0.8	22.3 $\pm$ 0.9	22.0 $\pm$ 0.9
<b>16 h</b>	23.0 $\pm$ 0.7	22.9 $\pm$ 1.3	22.0 $\pm$ 0.6	23.1 $\pm$ 0.7
<b>36 h</b>	21.2 $\pm$ 0.7	21.7 $\pm$ 0.5	21.9 $\pm$ 0.2	22.0 $\pm$ 1.0

## ANEXO III

Tablas con niveles de Lípidos Totales, Triglicéridos, Colesterol y Glucosa (mg/mL) en plasma de cabrilla sardinera *Mycteroperca rosacea* (Media  $\pm$  Desviación estándar) en los diferentes tratamientos hormonales. El tiempo 0 representa antes de la inyección.

<b>Lípidos Totales</b>				
<b>Tiempo</b>	<b>Placebo</b>	<b>LHRHa</b>	<b>GnRHa</b>	<b>hCG</b>
<b>0 h</b>	7.19 $\pm$ 1.37	7.36 $\pm$ 1.66	6.26 $\pm$ 0.85	6.65 $\pm$ 0.96
<b>16 h</b>	4.05 $\pm$ 1.73	2.65 $\pm$ 0.10	3.36 $\pm$ 0.87	3.13 $\pm$ 0.78
<b>36 h</b>	3.65 $\pm$ 1.87	2.35 $\pm$ 0.34 <sup>AB</sup>	2.70 $\pm$ 0.55	2.61 $\pm$ 0.79
<b>Triglicéridos</b>				
<b>0 h</b>	1.48 $\pm$ 0.22	1.43 $\pm$ 0.20	1.54 $\pm$ 0.21	1.54 $\pm$ 0.28
<b>16 h</b>	0.86 $\pm$ 0.48	0.88 $\pm$ 0.41	0.95 $\pm$ 0.28	0.95 $\pm$ 0.35
<b>36 h</b>	0.52 $\pm$ 0.21	0.57 $\pm$ 0.20	0.68 $\pm$ 0.26	0.62 $\pm$ 0.23
<b>Colesterol</b>				
<b>0 h</b>	1.50 $\pm$ 0.29	1.41 $\pm$ 0.20	1.25 $\pm$ 0.17	1.43 $\pm$ 0.26
<b>16 h</b>	1.29 $\pm$ 0.27	1.29 $\pm$ 0.3	1.15 $\pm$ 0.09	1.43 $\pm$ 0.27
<b>36 h</b>	1.39 $\pm$ 0.36	1.48 $\pm$ 0.21	1.27 $\pm$ 0.23	1.33 $\pm$ 0.28
<b>Glucosa</b>				
<b>0 h</b>	0.98 $\pm$ 0.13	1.00 $\pm$ 0.16	1.10 $\pm$ 0.13	0.47 $\pm$ 0.15
<b>16 h</b>	0.55 $\pm$ 0.12	0.49 $\pm$ 0.10	0.62 $\pm$ 0.10	0.57 $\pm$ 0.16
<b>36 h</b>	0.56 $\pm$ 0.12	0.42 $\pm$ 0.08	0.46 $\pm$ 0.13	0.45 $\pm$ 0.10