



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S. C.

Programa de Estudios de Posgrado

**MADURACION GONADAL DE HEMBRAS DEL
LENGUADO DE CALIFORNIA *Paralichthys californicus*
EN EL MEDIO NATURAL**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

p r e s e n t a

Mario Alberto Burgos Aceves

La Paz, B.C.S., Septiembre del 2003.

R E S U M E N

En el presente trabajo se describe por primera vez la histología del ovario y el patrón de desarrollo del ovocito en el lenguado de California *Paralichthys californicus* capturadas en la zona de Bahía Magdalena, B.C.S., México. La examinación de las gónadas reveló una organización funcional del ovario de tipo asincrónico y el establecimiento de ocho estadios ováricos englobados en cinco fases de desarrollo. Dos procesos importantes ocurren durante el desarrollo ovárico. Primero, transformación de la ovogonia a ovocito primario y secundario y subsecuentemente en alvéolo cortical, el cual es acompañado por un crecimiento en tamaño del ovocito dado por un incremento en el diámetro de la vesícula germinal y la formación de nucleolos. El segundo proceso de crecimiento involucra un dramático incremento en el diámetro del ovocito dado principalmente por la incorporación de proteínas extracelulares, vitelogenina (VTG), la cual es sintetizada en el hígado. Esta etapa del desarrollo gonadal está regulado por hormonas sexuales y está asociada con la elevación de los niveles de la vitelogenina sanguínea (VTG), vitelogenina hepática (Vtg), la lipovitulina ovárica (LVT) y de los esteroides sexuales 17β -estradiol (E_2) y testosterona (T) en hembras del lenguado de California. Los niveles de Vtg, VTG y LVT fueron significativamente elevados durante el periodo enero-mayo, y concuerdan con el tamaño máximo del ovocito y con la frecuencia del estadio de desarrollo gonadal. Los cambios en el nivel de concentración de E_2 y T están correlacionados con los de las vitelinas (Vtg, VTG y LVT). Se determinaron los parámetros ambientales de temperatura, fotoperiodo y salinidad durante el ciclo reproductivo de la especie. Tomando en consideración el crecimiento del ovocito, los niveles de las vitelinas se incrementaron durante la vitelogénesis hasta el estadio VI (migración de la vesícula germinal), mientras que los esteroides sexuales

alcanzaron su máxima expresión en el estadio VII (maduración final). Por lo tanto, los cambios en los niveles de las vitelinas y los esteroides sexuales reflejan el patrón de desarrollo gonadal y el comportamiento de desove de *P. californicus*, siendo este un patrón típico al descrito en la mayoría de los peces teleósteos con desoves múltiples e indican que la actividad reproductiva se lleva a cabo por un periodo de siete meses durante la primavera y principios de verano.

Palabras clave: lenguado de California; vitelinas; esteroides sexuales.

Dra. Celia G. Vázquez Boucard

A B S T R A C T

This paper describes for the first time the histology of the ovary and the seasonal patterns of oocyte growth in California halibut *Paralichthys californicus* captured throughout the year in the Magdalena Bay area, B.C.S., Mexico. Histological examination of ovarian sections revealed asynchronous oocyte development. Eight oocyte stages are included in five ovarian development phases. Two important processes occur during ovarian growth. First the oogonia develops into primary and secondary oocytes and subsequently into cortical alveoli which is accompanied by oocyte enlargement due to an increase in the germinal vesicle diameter and, the formation of nucleoli. The secondary growth stage involves a dramatic increase in oocyte diameter due to the incorporation of the yolk precursor, vitellogenin (VTG), which is produced in the liver. This stage of ovarian development is hormonally regulated and is accompanied by elevations of serum vitellogenin (VTG), hepatic vitellogenin (Vtg), ovaric lipovitellin (LVT) and sex steroid, 17 β -estradiol (E₂) and testosterone (T) in the California halibut. Vtg, VTG and LVT levels were significantly elevated during the January-May period, the period when the oocyte size is increasing and the ovary is rapidly recrudescing. The elevations in E₂ and T levels correlated well with those of vitellins (Vtg, VTG and LVT). The environmental parameters of temperature, photoperiod and salinity were determined during the reproductive cycle of this species. In relation to ovarian growth, the vitellins levels increased during vitellogenesis until stage VI (Germinal Vesicle Migration), whereas sex steroid levels remained high until stadium VII (Final Maturation). Hence, rising levels of vitellins and sex steroids reflected the pattern of oocyte growth and, the spawning behavior of *P. californicus*. These patterns are, typical of those described in most multiple spawning

species studied to date. And indicate the reproductive activity is underway seven-month period during spring and early summer.

Key words: California halibut; vitellins; sex steroids

Dr. Celia G. Vázquez Boucard

D E D I C A T O R I A

A Mis padres:

Anselmo Burgos Espinoza y Rosa Aceves Ochoa

A mis hermanos:

Elizabeth, Ricardo y Anselmo

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

Quiero agradecer enormemente a la Dra. Celia Vázquez Boucard, director del presente trabajo, por confiar en mi, brindarme todo su apoyo, conocimientos y comprensión pero sobre todo paciencia. Por sumergirme en este mundo de la investigación y darme su mano durante todo este camino andado. Gracias por todo...

Al Dr. Peter Thomas (co-tutor), investigador del Marine Science Institute de la Universidad de Texas en Austin, por formar parte del presente trabajo, permitirme realizar los ensayos radioinmunológicos así como por su excelente asesoría en la elaboración de la tesis. Gracias.

Agradezco a todo el personal del Programa de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por permitirme formar parte de esta grande institución y el apoyo otorgado a lo largo de estos tres años de estudio.

A Horacio Sandoval y Manuel Manero responsables del laboratorio de Computo de Posgrado por facilitar el acceso al material y equipo necesario para la elaboración del escrito de tesis. Gracias.

A la cMC. María del Carmen Rodríguez Jaramillo, responsable del laboratorio de Histología e Histoquímica del CIBNOR, por las asesorías en la descripción de los estadios de maduración del lenguado; a la técnico Teresa Arteché y Norma Olimpia Olgún por su apoyo en la elaboración de los cortes histológicos. Al Ing. Bioq. Martín Orozco por su tiempo en el asesoramiento del manejo de la técnica de Western Blot; al Técnico Ariel Cruz, responsable del Laboratorio de Cromatografía del CIBNOR, por su apoyo y elaboración en la técnica de purificación. A los técnico Jorge Angulo Calvillo y Carlos Ceseña por su apoyo en la captura de los ejemplares, toma de muestras y medición de los parámetros ambientales analizados en el presente trabajo. A todos ellos, gracias.

De manera muy especial quiero agradecer a la M. en C. Fabiola Arcos por su apoyo, asesoría y realización de los estadísticos así como por su sincera amistad.

Al Dr. Carlos Mazorra investigador del Seafish Aquaculture por su tiempo invertido en la revisión del escrito. Gracias.

Quiero agradecer desde lo más profundo de mi corazón, admiración y respeto a mis padres y hermanos por ese amor y apoyo incondicional que sólo ustedes saben dar. Este logro es de ustedes. Mil gracias.

A todos mis tíos y primos que de algún modo han sido cómplices en la realización de mis metas en especial a mi prima Lety Zúñiga. Gracias por su cariño.

A mis entrañables amigos Jesús, Cristina, Marisela, Diana, Bárbara, Miguel por lo vivido a lo largo de estos últimos años, su amistad, cariño y sobre todo la complicidad que nos une para ser lo que ahora somos. Siempre los recordare.

Finalmente este agradecimiento va dirigido con mucho cariño y respeto a todos mis compañeros de maestría y amigos de la Unidad de Patología por su amistad y apoyo.

Así mismo quiero darle las gracias a todos los demás que por espacio omití y que participaron de forma directa o indirecta en el presente trabajo.

C O N T E N I D O

Acta de Revisión de Tesis.....	I
Resumen.....	II
Abstract.....	IV
Dedicatoria.....	VI
Agradecimientos.....	VII
Contenido.....	VIII
Lista de figuras.....	XI
Lista de Tablas.....	XIII
Lista de Abreviaturas.....	XV
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	5
2.1 Identificación de la Especie.....	5
2.2 Distribución Geográfica.....	6
2.3 Hábitos Alimentarios.....	7
2.4 Biología Reproductiva.....	8
2.5 Fisiología Reproductiva.....	10
3. Hipótesis.....	16
4. Objetivo General.....	16
5. Objetivos Específicos.....	16
6. Metodología.....	17
6.1 Muestreo Mensual.....	17
6.2 Histología.....	18
6.3 Inducción Hormonal.....	21

6.4 Electroforesis.....	22
6.5 Purificación de Vitelogeninas.....	23
6.6 Preparación de Anticuerpos Anti-lipovitelina.....	23
6.7 Doble Inmunodifusión.....	24
6.8 Western Blot.....	25
6.9 ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay).....	28
6.10 RIA (Radioimmunoassay).....	30
6.11 Estadísticos.....	34
7. Resultados.....	35
7.1 Purificación de Vitelogeninas en Sangre.....	35
7.1.1 Estimulación a la síntesis de vitelogenina.....	35
7.1.2 Purificación.....	36
7.2 Titulación de los Anticuerpos Anti-Vitelinas para <i>P. californicus</i>	38
7.3 Especificidad de los Anticuerpos AcVtpc.....	39
7.4 Estandarización de ELISA.....	41
7.5 Parámetros Ambientales.....	42
7.6 Variables Morfométricas de los animales estudiados.....	44
7.7 Clasificación Histológica de Gónadas de <i>P. californicus</i>	45
7.8 Distribución de los estadios de desarrollo gonadal.....	51
7.9 Evaluación del nivel de concentración de vitelinas y esteroides vs. Peso Corporal.....	53
7.10 Evaluación de la variación en el nivel de concentración de vitelinas vs. Tiempo.....	55

7.11 Evaluación de la variación en el nivel de concentración de vitelinas vs. Estadio de desarrollo gonadal.....	58
7.12 Evaluación de la variación en el nivel de concentración de T y E ₂ vs. Tiempo.....	60
7.13 Evaluación de la variación en el nivel de concentración de T y E ₂ vs. Estadio de desarrollo gonadal.....	62
7.14 Evaluación del nivel de concentración de vitelinas y esteroides vs. Parámetros Ambientales.....	65
8. Discusión.....	73
9. Conclusiones.....	87
10. Referencias.....	88
Apéndice A.....	100

L I S T A D E F I G U R A S

Fig. 1 Ciclo de vida cerrado de los organismos para el desarrollo de un cultivo.....	2
Fig. 2 Distribución geográfica del lenguado de California <i>Paralichthys californicus</i>	7
Fig. 3 Ciclo de vida del lenguado de California <i>Paralichthys californicus</i>	8
Fig. 4 Huevo y Post-larva del lenguado de California <i>P. californicus</i>	9
Fig. 5 Eje Hipotálamo-Glándula Pituitaria-Gónada (HPG).....	11
Fig. 6 Sistema de retroalimentación simplificado entre el ovario y el hígado durante la vitelogénesis exógena.....	12
Fig. 7 Área de captura del lenguado de California en Baja California Sur.....	17
Fig. 8 Inyección intramuscular de 17 β -estradiol.....	21
Fig. 9 Respuesta a la inducción de vitelogénesis.....	35
Fig. 10 Electroforesis PAGE-Nativa en gel de poliacrilamida continuo 6% de suero de hembra inmadura.....	36
Fig. 11 Perfil de elusión del suero de hembra inmadura en cromatografía DEAE Sepharose CL-6B.....	37
Fig. 12 Electroforesis PAGE-Nativa en gel de poliacrilamida 6% del pico IV.....	37
Fig. 13 Curva de titulación de Anticuerpos Anti-Vitelina.....	39
Fig. 14 Doble inmunodifusión con varios antígenos.....	40
Fig. 15 Determinación de especificidad de los Ac Vtpc mediante Wester Blot.....	40
Fig. 16 Curvas paralelas transformadas a partir de diluciones seriales.....	41
Fig. 17 Curva estándar utilizada en la cuantificación de vitelinas.....	42
Fig. 18 Patrón de Temperatura, Salinidad y Fotoperiodo.....	43
Fig. 19 Análisis de regresión lineal entre Peso y Talla.....	45
Fig. 20 Foto-micrografía de los estadios I, II, III y IV.....	49

Fig. 21 Foto-micrografía del estadio V.....	49
Fig. 22 Foto-micrografía de los estadios IV, V y VI.....	50
Fig. 23 Foto-micrografía del estadio VII.....	50
Fig. 24 Foto-micrografía del estadio VIII.....	51
Fig. 25 Frecuencia de los diferentes estadios de maduración gonadal.....	52
Fig. 26 Distribución de talla de los ovocitos de las hembras de <i>P. californicus</i>	52
Fig. 27 Variación de los niveles de concentración de vitelinas y esteroides con relación al peso corporal.....	54
Fig. 28 Variación temporal de los niveles de concentración de vitelinas.....	56
Fig. 29 Niveles de vitelinas de acuerdo al estadio de desarrollo gonadal.....	59
Fig. 30 Cambios temporales de los niveles de Testosterona y 17 β -estradiol.....	61
Fig. 31 Cuantificación de los niveles de Testosterona y 17 β -estradiol de acuerdo al estadio de desarrollo gonadal.....	64
Fig. 32 Variación de los niveles de concentración de vitelinas con relación a la temperatura del agua.....	66
Fig. 33 Cambios en los niveles de Testosterona y 17 β -estradiol con relación a la temperatura del agua.....	66
Fig. 34 Variación de los niveles de concentración de vitelinas y esteroides con relación al fotoperiodo.....	69
Fig. 35 Variación de los niveles de concentración de vitelinas y esteroides con relación a la salinidad del agua.....	71

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

Tabla I. Rutina de tinción para Hematoxilina-Eosina de Harris.....	19
Tabla II. Rutina de tinción para Azul Alciano-PAS.....	20
Tabla III. Rutina de tinción para Sudán Negro B.....	20
Tabla IV. Variables Morfométricas de hembras silvestres capturadas.....	44
Tabla V. Estadios de maduración gonadal de hembras capturadas.....	48
Tabla VI. Niveles de concentración promedio de vitelinas y esteroides con relación al peso corporal.....	53
Tabla VII. Análisis de correlación entre el Peso Corporal con el desarrollo gonadal y vitelinas y esteroides.....	54
Tabla VIII. Niveles de concentración promedio de vitelinas de hembras silvestres durante el periodo de muestreo.....	55
Tabla XIX. Medias ajustadas a la covariable peso corporal de vitelinas.....	57
Tabla X. Niveles de concentración promedio de vitelinas con relación al estadio de desarrollo gonadal.....	58
Tabla XI. Medias ajustadas a la covariable peso corporal de vitelinas.....	60
Tabla XII. Niveles de concentración promedio de esteroides sexuales con relación a la temporada de muestreo.....	61
Tabla XIII. Medias ajustadas a la covariable peso corporal de esteroides sexuales.....	62
Tabla XIV. Niveles de concentración promedio de esteroides sexuales con relación al desarrollo gonadal.....	63
Tabla XV. Medias ajustadas a la covariable peso corporal de esteroides sexuales.....	64
Tabla XVI. Niveles de concentración promedio de vitelinas y esteroides con relación a la temperatura del agua.....	65

Tabla XVII. Medias ajustadas a la covariable peso corporal de vitelinas y esteroides sexuales.....	67
Tabla XVIII. Niveles de concentración promedio de vitelinas y esteroides con relación al fotoperiodo.....	68
Tabla XIX. Medias ajustadas a la covariable peso corporal de vitelinas y esteroides sexuales.....	69
Tabla XX. Niveles de concentración promedio de vitelinas y esteroides con relación a la salinidad del agua.....	70
Tabla XXI. Medias ajustadas a la covariable peso corporal de vitelinas y esteroides..	72

L I S T A D E A B R E V I A T U R A S

- 1) ac: Alvéolo cortical.
- 2) AcVtpc: Anticuerpo anti-vitelina específico para vitelinas de *P. californicus*.
- 3) ANOVA: Análisis de varianza.
- 4) ARN: Ácido Ribonucleico.
- 5) BSA: Suero de Albúmina Bovina.
- 6) C: Control
- 7) CIBNOR: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- 8) cm. : Centímetros.
- 9) DO: Densidad óptica
- 10) E₂: 17β-estradiol.
- 11) ELISA: Enzyme Linked immunosorbent assay.
- 12) E.S.: Error Estándar.
- 13) EtOH: Etanol.
- 14) G: Gónada.
- 15) gl: Gota lipídica.
- 16) GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas.
- 17) GtH: Gonadotropina.
- 18) gv: glóbulo de vitelo
- 19) H: Hipotálamo.
- 20) HCl: Ácido clorhídrico
- 21) h-L: Horas-Luz
- 22) HPG: Eje hipotálamo-pituitaria-gónada.
- 23) Kg: Kilogramo.

- 24) LT: Longitud total.
- 25) LVT: Lipovitelina.
- 26) MGV: Migración de la vesícula germinal.
- 27) NSB: Uniones no específicas.
- 28) nl: nucléolo.
- 29) P: Glándula pituitaria.
- 30) PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida.
- 31) PBS: Amortiguador Fosfato salino
- 32) PC: Peso corporal.
- 33) PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
- 34) PNP: p-nitrofenilfosfato.
- 35) PT: Proteínas Totales.
- 36) RB: Vacío.
- 37) RF: Frente de migración.
- 38) RIA: Radioimmunoassay.
- 39) RT: Recovery Tracer.
- 40) SAB: Steroid assay buffer.
- 41) SB: Solvente vacío.
- 42) SDS: Sodio dodecil-fosfato.
- 43) ST: Standar Tracer.
- 44) T: Testosterona.
- 45) TAS: Solución de Triethanolamina salina.
- 46) TC: Conteo total.
- 47) Tm: Toneladas métricas.

- 48) TNT: Amortiguador Tris-Sodio-Tween 20.
- 49) TRC: Conteo de recuperación total.
- 50) Tris: Tris(hidroximetil)aminometano.
- 51) VG: Vesícula Germinal.
- 52) Vt: Vitelinas.
- 53) VTG o Vtg: Vitelogenina.
- 54) 4C1N: 4.Cloro-1-Naphthol.
- 55) I: Perinúcleo temprano.
- 56) II: Perinúcleo tardío.
- 57) III: Alvéolo cortical.
- 58) IV: Vitelogénesis temprana.
- 59) V: Vitelogénesis tardía.
- 60) VI: Migración de la vesícula germinal.
- 61) VII: Maduración final.
- 62) VIII: Folículo post-ovulatorio.

1. INTRODUCCIÓN.

El lenguado de California *Paralichthys californicus* es un recurso pesquero de gran importancia en las costas del Pacífico Mexicano y en el sur de California de los Estados Unidos (Haaker *et al.*, 1975), manteniendo una significativa pesca comercial y deportiva desde inicios del siglo XX (Love y Brooks, 1990). Con un valor en el mercado superior a otras especies del mismo grupo (\approx 6-8 USD/Kg., Tupen, 1990), es una de las especies más consumidas en la zona de California y Baja California (Castillo-Sánchez, 1998). En 1990, la captura del lenguado de California alcanzó las 2,400 Tm de peso vivo, lo que representa un incremento de 1,400 Tm con relación a las capturas de 1985 (INP, 1999). Sin embargo, durante la última década, aunque el esfuerzo pesquero sobre el lenguado ha aumentado, el peso desembarcado ha disminuido drásticamente (Barsky, 1990). Así, se han reportado reducciones de más del 80% en la capturas totales multiespecíficas de lenguados en las costas de Baja California (García-Franco *et al.*, 1998).

De manera general, la pesca comercial mundial parece haber alcanzado un límite cerca de los 100 millones de toneladas métricas por año (Mellinger, 2002). Además, la desaparición de algunos inventarios de peces silvestres ha modificado el comportamiento de pescadores, quienes capturan en aguas profundas especies consideradas en otros tiempos sin interés, para lo cual utilizan artes de pesca no selectivas. Esta actitud ha contribuido a que el producto de la pesca disminuya de manera alarmante en los últimos años, mientras que la acuicultura comercial de peces para la alimentación humana y accesoriamente para la reconstitución de inventarios, se ha desarrollado intensamente. La búsqueda de nuevas especies susceptibles de ser

cultivadas constituye uno de los objetivos actuales en los programas de investigación acuícola. *P. californicus* es una especie robusta, fácil de domesticar y alimentar. Igualmente, ha demostrado que puede desovar de manera natural o inducida en cautiverio (Caddell et al., 1990), por lo que se le puede considerar con gran potencial de desarrollo acuícola.

Para poder iniciar la domesticación de una especie es necesario el manejo del ciclo cerrado (Fig. 1), es decir, poder someter a un grupo de organismos a condiciones artificiales de cultivo durante todo su ciclo de vida.

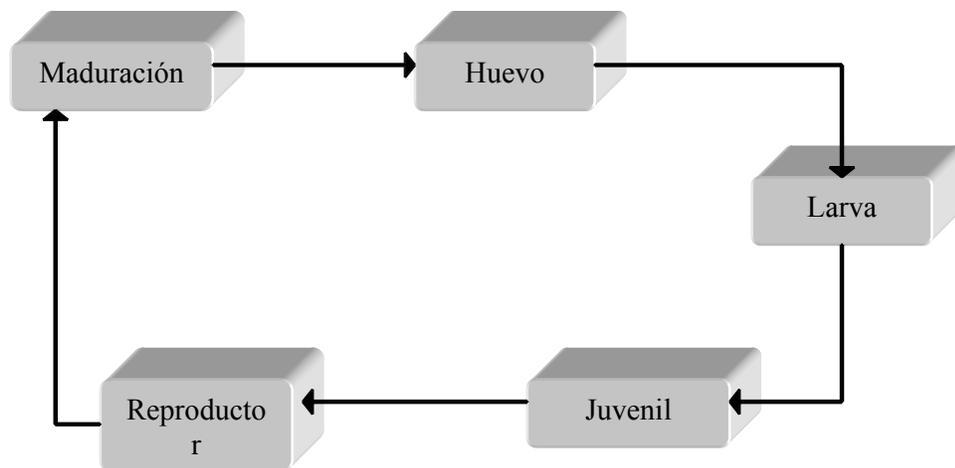


Figura 1. Ciclo de vida cerrado de los organismos para el desarrollo de un cultivo

Para ello, es necesario comprender aquellos aspectos de la biología de la especie, considerados cruciales dentro de un cultivo, como el proceso reproductivo, desarrollo embrionario, larval y crecimiento (Tait y Hickman, 2001). La ovogénesis puede considerarse como una de las etapas primordiales dentro del proceso reproductivo, ya que agrupa todas las transformaciones efectuadas por el ovocito para convertirse en un huevo listo para ser fecundado. El estudio de la ovogénesis, a escala celular, da

información necesaria sobre la organización funcional del ovario, la evolución de las células ováricas y la acumulación de las reservas en el ovocito. Por otra parte, a escala molecular nos permite adquirir conocimiento sobre las características de los ovocitos y el control de la ovogénesis, mediante el estudio de los mecanismos neuroendocrinos. Esta información es básica para la comprensión de los mecanismos fisiológicos y ambientales que controlan el proceso reproductivo (Brown-Peterson et al., 1988; Kokokiris et al., 2000), a la vez que proveen elementos valiosos sobre las características reproductivas de los peces teleósteos (Goetz, 1983; Pankhurst y Cornoy, 1988; Rahman et al., 2000). Con el conocimiento de dichos procesos se puede desarrollar nuevas técnicas para mejorar la fertilidad de los desoves, reducir periodos ínterdesove y aumentar la producción de gametos de calidad aceptable (Fostier y Jalabert, 1986; Pavlidis et al., 2000), lo que contrarresta posibles efectos negativos causados por el cautiverio mismo (Barcellos et al., 2001; Zohar y Mylonas, 2001) y permite lograr un mejor aprovechamiento del recurso.

La mayoría de los estudios realizados a la fecha en *P. californicus* se han enfocado hacia aspectos biológicos como el tamaño de los peces al adquirir la madurez sexual, la estación de desove, el desarrollo embrionario y larvario, entre otros (Haaker, 1975; Allen, 1990; Gadomski et al., 1990; Love y Brooks, 1990; Tupen, 1990; Innis, 1990; Oda, 1991; MacNair et al., 2001). Ningún estudio fisiológico básico del proceso reproductivo del lenguado de California ha sido efectuado, por lo que, en el presente trabajo se pretendió adquirir conocimientos sobre el desarrollo y el control de la ovogénesis, mediante una descripción a escala celular de las diferentes etapas del desarrollo gonadal y de la acumulación de reservas en el ovocito. A escala molecular,

de los cambios en el nivel de concentración de vitelinas (Vt) y esteroides sexuales (Testosterona y 17β -estradiol) presentes en sangre de hembras silvestres de *P. californicus*, durante la temporada reproductiva.

2. ANTECEDENTES.

2.1 Identificación de la Especie.

Los peces de la familia Paralichthyidae al igual que todos los peces Pleuronectiformes presentan una morfología característica: Son aplanados y con ambos ojos situados en el lado izquierdo de la cabeza, pero son frecuentes los casos de inversión en la posición de los ojos, que puede alcanzar ocasionalmente hasta un 50%. Presentan el borde del preopérculo libre, fácilmente visible, no oscurecido por piel y escamas. El género *Paralichthys* posee aletas pélvicas en posición simétrica a ambos lados de la línea media ventral. La línea lateral es evidente en ambos lados del cuerpo, donde forma un pronunciado arco sobre la aleta pectoral, prolongada por debajo del ojo inferior. La papila urinaria se ubica en el lado ocular, no adherida al primer radio anal (Fischer et al., 1995). Durante los primeros estadios larvarios, un ojo está localizado en cada uno de los lados de la cabeza, pero durante la metamorfosis un ojo migra a través de la región dorsal, hasta situarse ambos en un mismo lado de la cabeza (Haaker, 1975; Gadomski et al., 1990). El lado ocular de *Paralichthys californicus* está cubierto por escamas ctenoides en todas las tallas post-larvales; las del lado ciego son cicloides; presenta también pequeñas escamas accesorias dispersas entre las escamas anteriores. Por otro lado, *P. woolmani* presenta escamas cicloides en ambos lados del cuerpo en ejemplares de todas las tallas y *P. aestuarius* presenta escamas ctenoides del lado ocular en ejemplares menores de 16 cm de longitud total y cicloides en ejemplares mayores de unos 32 cm. La boca de juveniles y adultos de *P. californicus* y *P. aestuarius* es simétrica, larga y con dientes caninos fuertes y esbeltos, de tamaño moderado, uniseriados en ambas mandíbulas a diferencia de *P. woolmani* donde presenta dientes caninos fuertes, puntiagudos y progresivamente más grandes hacia delante (Fischer et

al., 1995). Las especies del género *Paralichthys* presentan ojos relativamente pequeños, un intestino sencillo y posee un cerebro con lóbulos olfatorios pequeños y lóbulos ópticos largos (Haaker, 1975). El cuerpo firme y una aleta caudal larga están asociados con la buena habilidad natatoria del pez lo que le permite arranques repentinos del fondo, ya sea para perseguir presas o escapar de depredadores (Allen, 1990). Los adultos de *P. californicus* presentan, del lado ocular, una coloración verdosa o café-verdosa, algunas veces moteada con sombras brillantes y oscuras; motas blancas pequeñas y del lado ciego un color de blanquecino a crema. Los peces jóvenes presentan una coloración que va de blanco-azulosa a crema y motas blanco-azulosas. Los adultos de *P. aestuarius* presentan, del lado ocular, una coloración café-chocolate pálido y los juveniles a veces con manchas oceladas. El lado ocular de *P. woolmani* presenta un color pardusco manchado y moteado de café oscuro, negro y blanco; manchas mejor definidas en las aletas medianas, especialmente la caudal que presenta 3 líneas transversales e irregulares de manchas (Fischer et al., 1995).

2.2 Distribución Geográfica.

El lenguado de California presenta una distribución desde el río Quillayute, Washington, EE.UU. hasta Bahía Magdalena, B.C.S., México (Fig. 2). Existe además, una población aislada en el Alto Golfo de California (Fischer et al., 1995). Vive generalmente sobre fondos de arena como en aguas litorales y hasta profundidades de 185 m, sin embargo resulta más abundante a menos de 18 m (Haaker, 1975; Fischer et al., 1995) y representa un porcentaje importante de la composición íctica de bahías y esteros (Castillo-Sánchez et al., 1998).



Figura 2. Distribución geográfica del lenguado de California *Paralichthys californicus*.

Los adultos pueden alcanzar 152 cm de longitud total y 33 Kg de peso, con una carne de excelente calidad y exquisito sabor (Haaker, 1975; Tupen, 1990; Oda, 1991; Torres-Orozco, 1991; Fischer et al., 1995).

2.3 Hábitos Alimentarios.

El lenguado de California se alimenta durante el día y la noche, pero muestra una tendencia diurna. Presentan una dieta variada que cambia con el crecimiento del pez. Durante el periodo larvario (0.7-2.0 cm), una vez consumido todo el vitelo, se alimenta de organismos planctónicos. En el periodo juvenil (2.0-8.0 cm) tiene una dieta constituida principalmente de pequeños crustáceos (anfípodos, copépodos, etc.) y peces pequeños (góbidos). Lenguados de 5.5 a 23.0 cm se alimentan de peces de tallas medias (*Atherinops affinis*, *Fundulus parvipinnis*, góbidos, etc.) y crustáceos grandes

(*Cragon* sp, *Callinassa* sp, entre otros). La mayoría de los peces mayores de 23 cm son principalmente piscívoros, y se alimentan de sardinas y anchovetas, donde aparecen en menor proporción algunas especies de camarones y calamares en sus intestinos. Pueden alimentarse también de macarelas y otros peces pequeños cuando su alimento preferencial es escaso (Haaker, 1975; Allen, 1990).

2.4 Biología Reproductiva.

En primavera, los adultos emigran de aguas profundas a aguas someras (5-18 m) cerca de la costa, principalmente lagunas, para desovar y llevarse a cabo la fecundación de los huevos. Las hembras de *P. californicus* son desovadoras parciales (Love y Brooks, 1990). La etapa de desove se lleva a cabo en un periodo comprendido entre febrero-agosto, donde mayo presenta ser el pico máximo (Allen, 1990). Después del desove los adultos regresan a aguas profundas (Fig. 3).

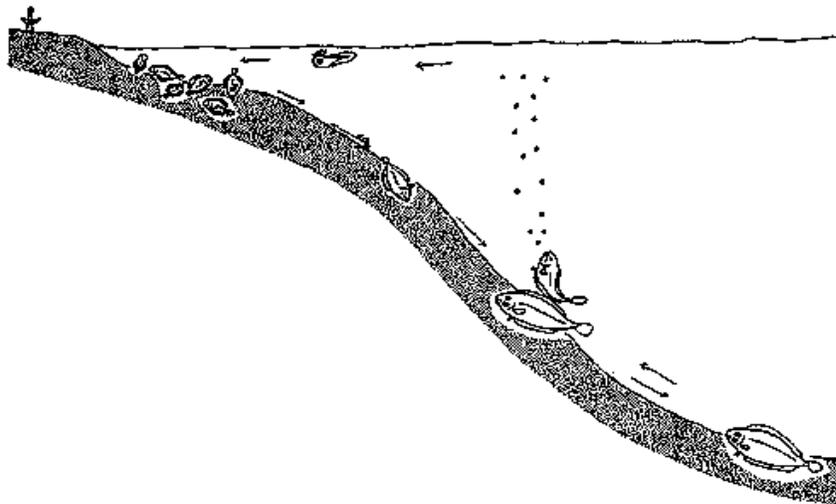


Figura 3. Ciclo de vida del lenguado de California *Paralichthys californicus*.

Los huevos (Fig. 4 A) son redondos (0.7-0.8 μm), pelágicos, de vitelo homogéneo, un espacio peri-vitelino de estrecho a moderado y un solo glóbulo de aceite de tamaño

pequeño. En el último estadio de huevo y primeros estadios larvarios, el glóbulo de aceite generalmente está situado en la parte anterior de la masa vitélica (Ahlstrom et al., 1983). Los estadios larval y post-larval son pelágicos por varios meses antes de que la post-larva (Fig. 4 B) adopte una vida bentónica (Allen, 1990; Oda, 1991).

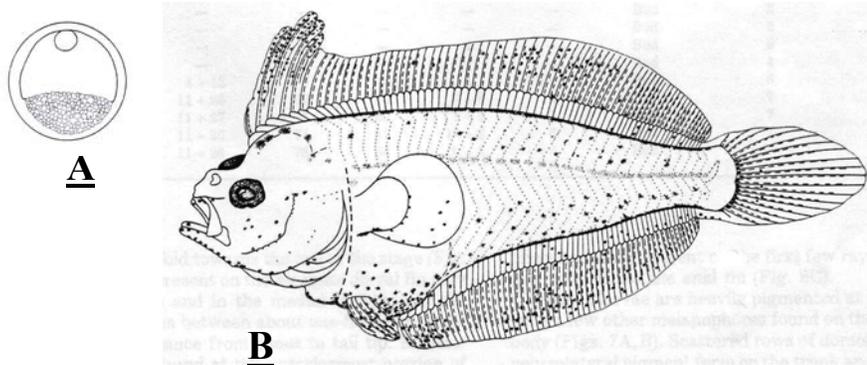


Figura 4. A) Huevo y B) Post-larva del lenguado de California *P. californicus*. Tomado de Oda (1991).

Viven en aguas de entre 12 a 45 m de profundidad y a una distancia de la costa de 1.9 a 5.4 Km. Los juveniles permanecen en aguas someras por aproximadamente dos años y no presentan desplazamientos amplios. Los machos, al alcanzar el estadio adulto (20 a 23 cm), migran hacia aguas profundas mientras que las hembras lo hacen en estadio sub-adulto (25 cm) (Kucas, et al., 1986; Allen, 1990).

El lenguado de California no presenta dimorfismo sexual aparente, por lo que la determinación del sexo se realiza a través de la examinación de las gónadas. En peces con tamaño menor de 5.0 cm no es posible determinar el sexo. En peces de 5.0 a 10 cm, las gónadas de machos y hembras presentan una apariencia similar tanto en tamaño como en color. Conforme aumentan de tamaño, las gónadas de las hembras se vuelven extremadamente cónicas, mientras que las de los machos presentan una forma cónica

obtusa (Haaker, 1975). En los peces de tamaño mayor de 10.0 cm la distinción entre los sexos es fácilmente observable por medio de una disección macroscópica. Las gónadas de los peces machos inmaduros se caracterizan por mostrar varios túbulos ramificados, mientras que los ovarios inmaduros contienen masas de células esféricas, presumiblemente células primarias. Las gónadas de hembras maduras presentan una coloración de amarillo a anaranjado, mientras que los machos tienen una coloración blanquecina a cremosa (Haaker, 1975).

La mayoría de las hembras maduran sexualmente alrededor de los 47 cm de longitud total (LT) o al final de su tercer año de vida y los machos, en su mayoría, maduran alrededor de los 23 cm LT o a finales de su segundo año de vida. El periodo de vida de estos animales comprende de alrededor de 30 años. Generalmente los machos son más pequeños y con un periodo de vida más corto que las hembras (Love y Brooks, 1990).

Una vez que se ha llevado a cabo la temporada de reproducción los huevos permanecerán en la columna de agua y su estado de desarrollo embrionario dependerá del tamaño del huevo, y más específicamente, de la cantidad de vitelo (Ahlstrom et al., 1983). Por lo tanto, el tamaño final del ovocito dependerá de factores como la edad, tamaño y condiciones nutricionales de la hembra.

2.5 Fisiología Reproductiva.

El proceso reproductivo en peces teleósteos exhibe un ritmo endógeno controlado por un “reloj biológico” (factores intrínsecos) y por factores ambientales (extrínsecos), tales como fotoperiodo, temperatura, presencia del sexo opuesto, etc. (Lam, 1983; Redding y Patiño, 1993; Dawson, 1998). Existen tres tejidos directamente involucrados en el

proceso reproductivo. Estos tres tejidos actúan recíprocamente vía mensajeros químicos (Fig. 5) y cada uno puede influir en los otros por medio de dichos mensajeros. Dichos tejidos son: hipotálamo (H), glándula pituitaria (P) y gónada (G), que en conjunto forman el eje hipotálamo-pituitaria-gónada (HPG) (Powell, 2000).

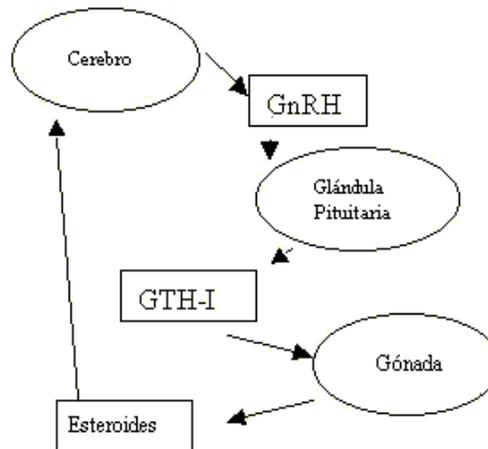


Figura 5. Eje Hipotálamo-Glándula Pituitaria-Gónada (HPG).

La traducción de dichos estímulos ambientales comienza con la activación de fotorreceptores y/o quimiorreceptores lo que transforma los estímulos ambientales en señales electroquímicas, enviadas al hipotálamo donde es secretada la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y liberada directamente frente a los gonadotróforos de la P (Peter, 1983). Ellos responden sintetizando y liberando dos tipos de gonadotropinas (GtH I y GtH II) al torrente sanguíneo hacia la G, donde la GtH I acelera la síntesis de testosterona (T), la cual dará origen al 17 β -estradiol (E₂). El hígado responde a este estímulo produciendo vitelogenina (VTG) la cual se libera al torrente sanguíneo. La G absorbe esta proteína y la incorpora en los ovocitos vía micropinocitosis (Fig. 6), lo que da comienzo al proceso de vitelogénesis o primera etapa de maduración (Ng e Idler, 1983; Dawson, 1998; Powell, 2000).

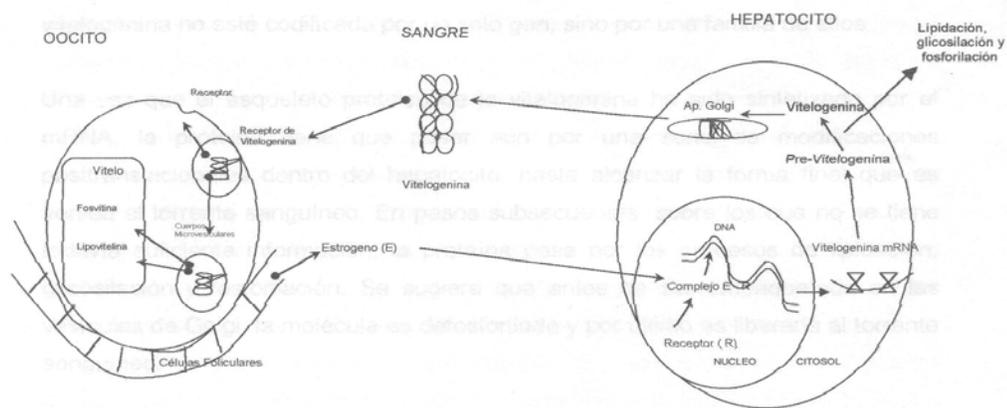


Figura 6. Sistema de retroalimentación simplificado entre el ovario y el hígado durante la vitelogenénesis exógena. Bajo la influencia de hormonas pituitarias las células foliculares liberan estrógenos al torrente sanguíneo. El estrógeno entra a las células diana (hepatocitos) por difusión facilitada. La vitelogenina es sintetizada, vertida al torrente sanguíneo y transportada hacia la gónada. La vitelogenina se une a un receptor proteínico específico en la membrana del ovocito e introducido por micropinocitosis dentro de cuerpos microvesiculares. Antes de la depositación final en el vitelo, la vitelogenina se descompone en lipovitelina y fosfovitina. Tomado de Mommsen y Walsh (1988)

La segunda parte del proceso es la maduración de la G, en esta parte del proceso, los gametos (ovocitos y espermatozoides) han alcanzado un tamaño apreciable y existe un cambio en el tipo de gonadotropina (GtH) sintetizada por la P, y por ende un cambio en los esteroides producidos por la G. Durante la vitelogenénesis, el ovario produce E_2 . Esta producción, cerca de la etapa de ovulación, cambia drásticamente a algún tipo de progesterona (11-keto-testosterona, $17\alpha,19\beta$, dihidroxi-progesterona, etc.). 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; Powell, 2000).

La inquietud por comprender el metabolismo de los esteroides sexuales relacionados con la fisiología reproductiva de los peces teleósteos comenzó a desarrollarse desde mediados del siglo XX (Eckstein, 1970; Colombo et al., 1972). En peces teleósteos, uno de los primeros estudios donde se evaluó el nivel de concentración de esteroides

sexuales en relación con el ciclo reproductivo, fue desarrollado en *Carassius auratus* en 1974 (Lamba et al., 1982). A partir de aquí se han desarrollado cada vez más estudios que permiten comprender mejor la fisiología reproductiva de las especies de interés para la piscicultura (Scott et al., 1980; Fostier y Jalabert, 1986; Rosenblum et al., 1987; Pankhurst y Cornoy, 1988; Rahman et al., 2000; Barcellos et al., 2001; Larsson et al., 2002).

El evaluar el nivel de algunos esteroides sexuales en sangre puede proveer información acerca del funcionamiento del eje HPG, antes, durante y después del proceso reproductivo o bien como indicadores de la capacidad reproductiva (Pottinger y Carric, 2000). El papel de los esteroides sexuales en un principio era determinado mediante estudios histológicos, sin embargo, debido a que los resultados presentaban un alto margen de error o eran contradictorios, se desarrollaron técnicas alternativas que permitieran obtener resultados confiables (fluorimetría, ensayo de unión competitiva, etc.). El ensayo radio-inmunológico (siglas en inglés, RIA), es una técnica que se ha estandarizado para la medición de esteroides y otras hormonas en diversas especies de peces (Crim et al., 1973; Lamba et al., 1982; Smith y Thomas, 1991) y que hasta la fecha se sigue empleando (Larsson et al., 2002). La asociación del desarrollo gonádico con el nivel de concentración en sangre de algunos esteroides sexuales, principalmente T y E₂, durante el ciclo reproductivo, ha probado ser una herramienta de gran valor para el entendimiento del control endocrino sobre la reproducción en peces teleósteos (Kagawa et al., 1982; Pankhurst y Cornoy, 1987, 1988; Kokokiris et al., 2000; Rahman et al., 2000).

Por otro lado, en algunos teleósteos ovíparos, el desove se repite varias veces a intervalos regulares. Estos peces extienden la reproducción en uno, dos o hasta tres meses, durante los cuales las condiciones ambientales varían, lo que favorece la supervivencia de la progenie. En este grupo de peces, la examinación microscópica del desarrollo ovárico muestra la dinámica de la ovogénesis, es decir, que se desarrolle de manera sincrónica o asincrónica, y la descripción citológica de los diversos estadios de la misma. Este tipo de estudios se ha realizado en algunos peces planos, dentro de los cuales existen dos especies de la familia Paralichthyidae: *P. olivaceus* y *P. dentatus* (Merson et al., 2000). No existen estudios microscópicos publicados para *P. californicus*.

El vitelo está constituido por un conjunto de sustancias orgánicas almacenadas en el citoplasma del ovocito y utilizadas durante el desarrollo embrionario. El vitelo constituye entonces la única fuente de energía y de materia orgánica para el embrión ovíparo. No todas las sustancias orgánicas del huevo constituyen el vitelo, es necesario separar los siguientes componentes: moléculas de ARNm, moléculas que contribuyen a la construcción de los ribosomas y al funcionamiento del sistema de biosíntesis proteínica, proteínas implicadas en la mitosis de segmentación del ovocito, pigmentos respiratorios, así como inmunoglobulinas y otros agentes del sistema inmune, transferidos por este medio a la progenie.

En los peces teleósteos, el vitelo, de naturaleza lipoglicoproteínica, proviene de un precursor de origen hepático llamado vitelogenina (Vtg) en respuesta al esteroide sexual E₂, producido en los folículos ováricos, bajo el efecto del aumento de la secreción de las

gonadotropinas sintetizadas por la hipófisis. En la mayoría de los teleósteos estudiados, la VTG circula en la sangre bajo la forma de una apoproteína asociada a lípidos (lipoproteína). La VTG se distingue de otras lipoproteínas por el menor porcentaje de lípidos que contiene. En pleuronéctidos se encontraron niveles de lípidos en VTG comprendidos entre 16 y 20 % (Norberg, 1995; Silversand et al., 1996). Mediante un proceso de endocitosis intenso, la VTG es incorporada al ovocito y transformada por la actividad proteolítica en dos o tres vitelinas diferentes (Balestra et al., 1989; Tyler y Sumpter, 1990; Johanning y Specker, 1995; Bhakta y Nath, 1996; Matsubara y Koya, 1997; Matsubara et al., 1999) cuya digestión ulterior proveerá los aminoácidos, ácidos grasos, glicerol y fosfatos necesarios para el desarrollo embrionario.

La medición de los niveles de VTG en sangre ha sido empleada en diferentes áreas de estudio: Para la determinación del sexo en peces teleósteos (Takemura y Oka, 1998), como indicador de trastornos en la diferenciación sexual (Kime et al., 1999), como indicador de la capacidad reproductiva en crustáceos (Arcos et al., 2002), así como su relación con las hormonas sexuales (Ueda et al., 1984; Kokokiris et al., 2000; Pavlidis et al., 2000; Reis-Henriques et al., 2000; Larsson et al., 2002). Una de las técnicas más eficientes para medir VTG es el ensayo inmuno-enzimático (siglas en inglés, ELISA), donde se emplean anticuerpos específicos anti-vitelina de la especie y se lleva a cabo una reacción antígeno-anticuerpo lo cual permite evaluar los niveles de concentración de VTG en sangre y en otros tejidos implicados (Mañanos et al., 1994; Hartling et al., 1997; Lomax et al., 1998; Heppell y Sullivan, 1999; Susca et al., 2001; Larsson et al., 2002; Schafhauser-Smith y Benfey, 2002).

3. HIPÓTESIS.

Durante el ciclo reproductivo de las hembras silvestres de *Paralichthys californicus* existe una interacción fisiológica entre las vitelogeninas y los esteroides sexuales transportados en sangre y el desarrollo de la maduración gonadal.

4. OBJETIVO GENERAL.

4.1 Describir a escala microscópica los diferentes estadios de desarrollo gonadal para hembras silvestres de *Paralichthys californicus*, correlacionarlos con los cambios en los niveles de concentración de vitelogenina, testosterona y 17 β -estradiol sanguíneo y la posible influencia de factores ambientales dentro del ciclo reproductivo.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

5.1 Describir la organización funcional y el crecimiento ovogénico para cada estadio de desarrollo gonadal en hembras silvestres de *Paralichthys californicus*.

5.2 Evaluar los cambios en los niveles de concentración de vitelinas en sangre, hígado, ovario y esteroides sexuales testosterona y 17 β -estradiol dentro del ciclo reproductivo en hembras silvestres de *Paralichthys californicus*.

5.3. Describir los parámetros ambientales necesarios para el desarrollo del ciclo reproductivo en medio natural de hembras silvestres de *Paralichthys californicus*.

6. METODOLOGÍA.

6.1 Muestreo Mensual.

Mensualmente se capturaron mediante la pesca con caña y anzuelo un total de 82 hembras de lenguado de California *P. californicus*, en la zona de Bahía Magdalena, B.C.S., México (Fig. 7) por un periodo de nueve meses comprendido entre diciembre de 2001 a agosto de 2002. Se midió la longitud total (LT) y el peso corporal (PC) para cada hembra capturada. Se registraron los parámetros ambientales temperatura y salinidad al momento de la recolecta. El fotoperiodo, para la zona de San Carlos, se obtuvo mediante el programa de predicción de mareas CICESE-MAR V 0.4 2000, diseñado por Juan I. González del Departamento de Oceanografía Física.



Figura 7. Área de captura de lenguado de California en Baja California Sur.

In situ, se extrajeron 3 mL de sangre a cada ejemplar con una jeringa de 3 mL y se depositaron en tubos eppendorff de 1.5 mL de capacidad que contenían c/u 100 μ L de fluoruro de fenilmetilsulfonilo 10 mM (PMSF) como inhibidor proteolítico. Los tubos

se transportaron en hielo hasta el laboratorio donde se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 min. a 4°C. Se separó el suero y se almacenó a -80 °C hasta su posterior análisis (Matsubara et al., 1999). Pequeñas porciones de tejido gonádico y hepático fueron removidas, congeladas y transportadas en nitrógeno líquido al laboratorio donde se almacenaron en ultra-congelación a -80 °C, hasta su posterior análisis. Porciones de la parte anterior, media y posterior del tejido gonádico se preservaron en solución Davidson's para el desarrollo de los análisis histológicos pertinentes.

6.2 Histología.

Las porciones gonádicas recolectadas de las 82 hembras silvestres de *P. californicus* se procesaron por técnicas histológicas establecidas (Hematoxilina-eosina; Humanson, 1977) y las técnicas histoquímicas de Azul Alciano-PAS (Sheehan y Hrapchak, 1980) y Sudán Negro (Bayliss, 1984), bajo el siguiente procedimiento:

Fijación. Porciones anterior, media y posterior de gónada de cada una de las hembras capturadas se colocaron en una solución fijadora Davidson's (ver apéndice A) 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% hasta su llegada al laboratorio.

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 parafina-xilol y parafina I, II y III (punto de fusión 54-56°C). 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 micras de grosor para cada uno de los tejidos. 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 apéndice A) como se enumera en la Tabla I.

Tabla I. Rutina de tinción para Hematoxilina-Eosina de Harris.

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

Para el análisis histoquímico otra serie de cortes se sometieron al mismo proceso previamente descrito para la técnica de histología clásica HE, hasta llegar a la etapa de inclusión y corte y los tres primeros pasos del proceso de tinción. La técnica de tinción

con Azul Alciano-PAS se utilizó con la finalidad de evidenciar la presencia de mucopolisacáridos ácidos y neutros, resaltando así la presencia de alvéolos corticales. Para ello, los cortes fueron sumergidos en una serie de soluciones y colorantes (ver apéndice A), como se describe en la Tabla II.

Tabla II. Rutina de tinción para Azul Alciano-PAS.

Paso	Solución
1	1-5 Tabla I
2	Azul Alciano 8 GX
3	H ₂ O
4	Ácido peryódico 0.5%
5	H ₂ O
6	Reactivo de Schiff's
7	Solución sulfurosa 100%
8	H ₂ O
9	Hematoxilina férrica de Weigert
10	H ₂ O
11	Etanol 96%
12	Etanol 100%
13	Xilol 100%
14	Montaje en Resina o entellan

La presencia de fosfolípidos y triglicéridos dentro de los ovocitos se evidenció mediante la técnica de tinción de Sudán Negro. Los cortes histológicos se sumergieron en una serie de soluciones y colorantes (ver apéndice A) como se describe en la Tabla III.

Tabla III. Rutina de Tinción para Sudán Negro B.

Paso	Solución
1	1-3 Tabla I
2	Sudán Negro
3	Etanol 70%
4	Hematoxilina de Harris
5	H ₂ O
6	Montaje Gelatina glicerizada

6.3 Inducción Hormonal.

Ante la necesidad de aislar VTG, con el fin de obtener una curva de referencia que nos permitiera evaluar el nivel de concentración de vitelinas de las hembras silvestres durante el tiempo de estudio, tres hembras inmaduras (0.9-1 Kg.) capturadas en la zona de Bahía Magdalena (Fig. 7) fueron estimuladas a la síntesis de VTG por medio de E_2 .

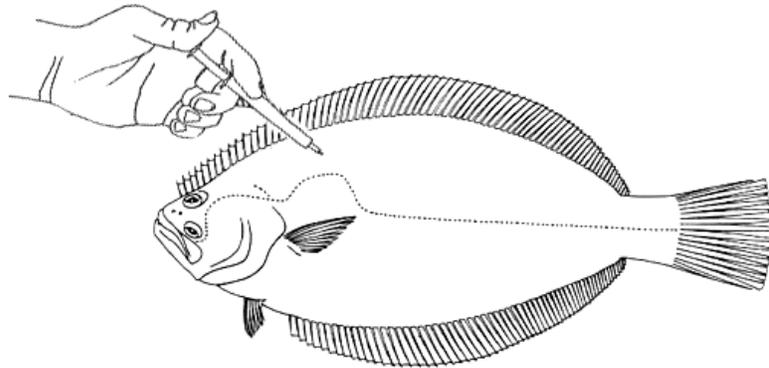


Figura 8. Inyección intramuscular de 17β -estradiol en la zona dorsal por encima del punto máximo de la línea lateral

Las hembras inmaduras (H_1 , H_2 , H_3) se mantuvieron en tanques azules de fibra de vidrio (1.5 m de altura x 3.0 m diámetro) con temperatura ambiente y fotoperiodo natural. Se les aplicaron tres inyecciones intramusculares (1x día durante tres días) de E_2 disuelto en propilenglicol (1 mg/40 μ L), en la parte superior dorsal por encima del arco de la línea lateral (Fig.8). La concentración utilizada fue de 5 mg de E_2 por kilogramo de peso corporal húmedo. Pevio a la aplicación de la primera inyección y tres días posteriores a la última, se tomó muestra de sangre de cada pez para lo cual se utilizaron jeringas de 3 mL, las muestras fueron colocadas en tubos eppendorff que contenían PMSF 10 mM sin anticoagulante. Se dejaron en reposo por 30 min. a 4 °C y se centrifugaron a 5000 rpm por 15 min. a 4 °C. El suero de cada muestra se separó y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior análisis (Matsubara et al., 1999).

6.4 Electroforesis

Las vitelogeninas en sangre, de hembras inmaduras estimuladas con E_2 , fueron identificadas por medio de una electroforesis en gel continuo de poliacrilamida al 6% (6.5 x 9 cm con un grosor de 1.5 mm) PAGE-Nativa (Wiley, *et al.*, 1979). En seis tubos eppendorff se colocó 1.5 μL ($\approx 10 \mu\text{g}$) de Proteínas Totales (PT) de cada una de las muestras de suero previo a la estimulación con E_2 (H_1 , H_2 , H_3) y posterior a la estimulación (H_{1E} , H_{2E} , H_{3E}). Las muestras se diluyeron en 14 μL de TRIS-HCl 1.5 M, pH 8.8 y 5 μL de mezcla de azul de bromo-fenol al 1.5% y glicerol al 25%. La electroforesis se llevó a cabo en cuarto frío a 4 °C en una cámara de electroforesis Mini-Protean III (Bio-Rad) con una corriente constante de 75 V y 50 V al inicio (20 min.) en presencia de un amortiguador TRIS-Glicina (Trizma base 248 mM, Glicina 1.2 M, pH 8.8) por un tiempo aproximado de 2.5 h. Finalizado el corrimiento de la muestra a través del gel, visualizado mediante la evacuación total del azul de bromo-fenol, se extrajo el gel de la cámara y se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250 (Azul de Coomassie 0.25%, metanol 50% v/v, ácido acético 10%) y desteñido en metanol 40%, ácido acético 10% y $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ 50% con la finalidad de revelar la presencia de fracciones proteínicas. Otra porción del gel se tiñó con Sudán Negro (0.5 gr. Sudán negro, 20 mL acetona, 15 mL ácido acético y 100 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$) y se destiñó en ácido acético 15%, acetona 20% y $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ 65% para revelar la presencia de lípidos. Con la finalidad de revelar la presencia de carbohidratos otra porción del gel se tiñó con reactivo de Schiff's y se destiñó en tres cambios de ácido peryódico al 10% a temperatura ambiente.

Con la finalidad de determinar el peso molecular de las vitelogeninas identificadas, se llevó a cabo una electroforesis PAGE-Nativa donde se colocaron 25 μL de la elusión

obtenida del pico IV más 5 μ L de azul de bromo fenol en un gel de poliacrilamida en presencia de un amortiguador Tris-glicina. El frente de migración (Rf) de la proteína purificada, se comparó con las proteínas de peso molecular establecido en un kit de calibración para electroforesis HMW (Amershan Pharmacia Biotech.) del cual se cargó \approx 10 μ L sin tratamiento previo. El kit contiene tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), catalasa (230 kDa), lactato deshidrogenasa (140 kDa) y albúmina de suero bovino (67 kDa).

6.5 Purificación de Vitelogeninas.

Las vitelogeninas identificadas en sangre de *P. californicus* fueron purificadas por cromatografía en una columna DEAE Sepharose CL-6B, equilibrada con amortiguador Tris-HCl 100 mM (pH 7.8), que contenía PMSF 1mM. El suero de la hembra estimulada con E₂ se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. a 4 °C, corriéndose 1 mL de la muestra, a un flujo de 0.2 mL/h. Las eluciones de 2.5 mL fueron colectadas en tubos de ensayo de 5 mL. Con la finalidad de ubicar la presencia de las vitelogeninas dentro de una de las eluciones obtenidas, se efectuó una electroforesis PAGE-Nativa tomando 25 μ L de cada elusión, colocados en un gel de poliacrilamida 6%. Previo a la electroforesis las eluciones obtenidas se concentraron por centrifugación para lo cual se utilizaron tubos de centrifugación con membranas Amicon de 10,000 Da.

6.6 Preparación de Anticuerpos Anti-lipovitelina.

Los anticuerpos anti-vitelina (AcVtpc) fueron preparados a partir de extractos de ovarios de *P.californicus* (Hara et al., 1993; Hyllner et al., 1994; Johnsen et al., 1999). Se realizó una electroforesis preparativa en un gel de poliacrilamida 6% bajo las mismas

condiciones de PAGE-Nativa. Finalizada la trayectoria, se cortó de forma vertical una pequeña porción del gel en ambos extremos y las bandas proteínicas fueron reveladas con azul brillante de Coomassie R-250. Una vez visualizada la lipovitelina (LVT) del ovario, previamente identificada por electroforesis PAGE-nativa, se empataron las porciones teñidas en los extremos del gel sin teñir. Se cortó de forma transversal la porción del gel sin teñir que contenía LVT. Asimismo, fue preparada una emulsión con coadyuvante completo de Freund y 50 μg LVT/mL. A dos conejos de tres meses de edad, obtenidos del Bioterio del CIBNOR, se les aplicó una inyección subcutánea de la emulsión preparada. Se preparó una segunda emulsión con adyuvante incompleto de Freund y 120 μg LVT/mL, la cual fue aplicada diez días posteriores a la primera inyección. Se preparó nuevamente una emulsión similar a la anterior para aplicarse treinta días posteriores a la segunda inyección. Diez días posteriores a la tercera inyección se realizó un sangrado de la oreja del conejo y se extrajeron 50 mL de sangre, dejándose a temperatura ambiente en tubos de centrifuga Beckman hasta que se hubo separado el coágulo de las paredes del tubo. Se centrifugó (Beckman J2-HS, rotor JA-20) a 2500 rpm por 10 min. a 4 °C. Se recolectó el suero en tubos eppendorf (≈ 1 mL) y se congeló a -80 °C. Se realizó un segundo sangrado siete días posteriores al primero y se obtuvo suero con el mismo procedimiento anteriormente señalado.

6.7 Doble inmunodifusión.

Con el fin de determinar la identidad inmunológica de la LVT del ovario y la VTG en sangre e hígado de *P.californicus*, se efectuó una técnica de doble inmunodifusión en agarosa (Ouchterlony, 1948). Este método está basado en el principio de que el antígeno y el anticuerpo se difunden a través de un medio semisólido formando

complejos inmunitarios estables que pueden ser analizados visualmente, permitiendo comparar entre las muestras las reacciones antigénicas de las proteínas frente a un mismo anticuerpo. Estas reacciones determinaran el grado de identidad inmunológica que poseen las diferentes proteínas analizadas. La identidad inmunológica constatada con la utilización de esta técnica va a confirmar la pureza de los AcVtpc, fabricados por el conejo.

Un gel de agarosa (300 mg de agarosa disuelta en 20 mL de NaCl 0.9% a 100 °C) se preparó sobre una placa de vidrio dispuesto en una mesa nivelada dejándola polimerizar. Con una pipeta de vidrio de 1 mL, se horadaron pequeños pozos en la placa de agar separados 9 cm entre sí. Los pocillos excavados se llenaron con $\approx 10 \mu\text{L}$ de antígeno (sangre, hígado, etc.). El pocillo central se llenó con $\approx 10 \mu\text{L}$ del AcVtpc. La difusión se efectuó durante 18 h en una cámara húmeda a 4 °C. Con el fin de eliminar las proteínas no precipitadas se realizó una serie de lavados con NaCl 0.9% por un periodo de 48 h. Se cubrió la placa con papel Whatman No. 1 húmedo y se dejó toda la noche a 60 °C. La placa se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250 durante 5 min. y se decoloró según la técnica descrita para electroforesis.

6.8 Western Blot.

La especificidad de los AcVtpc fue confirmada mediante la técnica de Western Blot. Esta técnica se emplea para detectar, en una mezcla de proteínas o fragmentos de proteínas, las que reaccionan con el mismo anticuerpo. Se procede con la separación de la mezcla de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en medio disociante. Finalizado la trayectoria del gel, las proteínas son transferidas a una

membrana de nitrocelulosa e incubada con una solución de anticuerpos específicos dirigidos contra las proteínas de interés. Finalmente, se revela dicha reacción agregando una solución de un segundo anticuerpo ligado a una enzima resultando una banda visible (Mathews y Van Holde, 1998).

En una cámara de electroforesis Mini-Protean III, se llevó a cabo un corrimiento de dos geles de poliacrilamida discontinuo 4-12% con dodecil sulfato de sodio al 10% (SDS) como medio disociante (PAGE-SDS) en presencia de un amortiguador TRIS-Glicina-SDS 0.5 M, pH 8.8 (Tris-HCl 25 mM, Glicina 250 mM, SDS 0.1% w/v). Muestras de suero de hembra inmadura, hembra inmadura estimulada, ovario, hígado y suero de hembra madura, suero e hígado de macho, se corrieron a través del gel por un periodo de 3 h a una velocidad constante de 20 mA. Previo a la carga de las muestras dentro del gel, las muestras se incubaron (10 min. a 95 °C) en tubos eppendorff de 1.5 mL en una solución TRIS-HCl 0.5 M, pH 6.8, SDS 10%, mercaptoetanol 1%, azul de bromo-fenol 1.5% y glicerol 25%. Finalizado el corrimiento, se extrajeron los geles de la cámara de electroforesis. Un gel fue teñido con azul brillante de Coomassie R-250, con el fin de visualizar el patrón de corrimiento de las fracciones proteínicas.

Transferencia semi-seca: El segundo gel, la membrana de transferencia Immobilon-P con tamaño de poro 0.45 μm (SIGMA) y dos papeles filtro se equilibraron en un amortiguador de transferencia Dunn (10 mM NaHCO_3 , 3 mM Na_2CO_3 , metanol 20%, pH 9.9) por 30 min. a temperatura ambiente. Previo a la etapa de equilibrio, la membrana se mantuvo en metanol al 100% por 5 min. Esto con la finalidad de volverla hidrosoluble. Se colocó un papel filtro sobre el ánodo del Trans-Blot y sobre éste se

colocó la membrana, el gel y otro papel filtro. Se colocó el cátodo y se inició la transferencia durante 15 min. a 25 V. Finalizado el proceso, el gel se tiñó con azul de Coomassie R-250 con el fin de evidenciar la eficiencia de transferencia.

Bloqueo: Se incubó la membrana en una solución TNT (Trizma base 10 mM, NaCl 0.15 M, Tween-20 0.05%, pH 8) con leche descremada 5% (Bio-Rad). Se dejó en incubación por 1 h a temperatura ambiente en agitación constante. Esto con la finalidad de bloquear las uniones no específicas en la membrana.

Lavados: En cada una de las siguientes etapas dentro del análisis se realizaron lavados a la membrana (3x20 min. c/u) con amortiguador TNT.

Primera reacción inmunológica: Se agregó el primer anticuerpo anti-vitelina específico para Vt de *P. californicus* (AcVtpc), diluido 1:3000 en amortiguador TNT, a la membrana. Se dejó en incubación toda la noche a 4°C.

Segunda reacción inmunológica: Se agregó el segundo anticuerpo con conjugado peroxidasa y dirigidos contra anticuerpos de conejo (SIGMA) diluido 1:5000 en amortiguador TNT. Se dejó en incubación por 2 h a temperatura ambiente.

Revelación inmunoenzimática del complejo antígeno-anticuerpo: Se disolvió una tableta de 4-Cloro-1-Naphthol (4C1N -SIGMA-) en 10 mL de metanol absoluto. Se tomó 2 mL de 4C1N y se adicionó 10 mL de amortiguador de Triethanolamina salina TAS (NaCl, C₆H₁₅NO₃, HCl 1 M, H₂O_{Des.}, pH 7.5). Finalmente, se agregaron 5 µL de peróxido de hidrógeno al 30%. Se dejó incubar la membrana a temperatura ambiente y en oscuridad por aproximadamente 10-15 min. Se detuvo la reacción enjuagando la membrana con agua destilada y se secó entre dos hojas de papel filtro. La presencia del antígeno provoca la aparición de una coloración marrón localizada en la membrana.

6.9 ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*).

En el análisis inmunosorbente ligado a una enzima se emplea un reactivo de entrecruzamiento para acoplar covalentemente una enzima a un anticuerpo que se está utilizando para una sustancia concreta. La técnica empleada en el presente trabajo es la del método indirecto o no competitivo, basado en aquel estandarizado por Vázquez-Boucard et al. (2002), y se funda en el procedimiento de antiglobulina o de emparejado inmunológico (Barrett, 1985). Esta técnica tiene como principio analizar los anticuerpos unidos midiendo la actividad de la enzima conjugada mediante espectrofotometría (Mathews y Van Holde, 1998).

Preparación de homogeneizados de ovario e hígado. Se obtuvieron homogeneizados de pequeñas porciones de tejido ovárico y hepático (≈ 0.5 g), utilizando un amortiguador 0.5 M TRIS-HCl con 0.05M NaCl y 5mM EDTA, pH 7.0 para ovario (Chang *et al.*, 1996) y un amortiguador 100 mM NaH₂PO₄-H₂O con 1 mM EDTA, pH 7.0 para hígado. Antes de la descongelación total de los tejidos se agregó 120 μ L de PMSF 10 mM como inhibidor de proteasas. La homogeneización se efectuó en un potter de vidrio manual en un volumen de 3:1 (amortiguador: muestra) en hielo para evitar la elevación de la temperatura por la fricción y evitar la degradación de proteínas. El homogeneizado de ovario se centrifugó (Beckman J2-HS; rotor JA-20) a 7000 rpm durante 15 min. a 4 °C con el fin de eliminar los desechos celulares. El sobrenadante del extracto de ovario y el homogeneizado de hígado se colocaron en tubos eppendorf (≈ 500 μ L) y se mantuvieron en congelación a -80 °C hasta su posterior análisis.

Fijación. Alícuotas de extracto de ovario, hígado y suero ($\approx 150 \mu\text{L}/\text{pozo}$) ($100 \mu\text{g}/\text{mL}$ PT) de cada una de las 82 hembras capturadas y una serie de diluciones de la VTG purificada (20, 40, 60, 80, 100, 200, 400, 600, 800 ng/mL), diluidas en amortiguador carbonato-bicarbonato 50 mM, pH 9.6 (Na_2CO_3 , NaHCO_3 , NaN_3 20%) se colocaron individualmente en una placa de micro-titulación (4 réplicas por muestra). Las muestras se incubaron toda la noche a 4°C para llevar a cabo el proceso de fijación de las Vt sobre la fase sólida de la placa de micro-titulación.

Lavado. A continuación, los pozos de la placa de micro-titulación fueron sometidos a cuatro intensos lavados ($\approx 200 \mu\text{L}/\text{pozo}$), con intervalos de 5 min. cada uno, con solución amortiguadora fosfato salino PBS-T (K_2HPO_4 0.01 M, KH_2PO_4 0.01 M, NaCl 0.15 M, Tween-20 0.05%, pH 7.4). Esto con la finalidad de eliminar exceso de proteínas no fijadas en la fase sólida.

Saturación. Los sitios libres de la fase sólida de la placa fueron saturados agregando $\approx 200 \mu\text{L}/\text{pozo}$ de amortiguador PBS-T-BSA 0.5% (suero de albúmina bovino) mediante una incubación de media hora.

Incubación anticuerpo específico. Se depositaron $\approx 150 \mu\text{L}/\text{pozo}$ del anticuerpo específico AcVtpc, a una concentración de 1:3000 (anticuerpo-amortiguador) diluido con amortiguador PBS-T-BSA y se dejó en incubación durante tres horas a 37°C .

Incubación segundo anticuerpo. Se depositaron $\approx 150 \mu\text{L}/\text{pozo}$ del segundo anticuerpo acoplado a la enzima fosfatasa alcalina, utilizado contra los anticuerpos de conejo (Sigma) en una dilución 1:5000 y se incubó por dos horas a 37°C .

Revelación inmuno-enzimática del complejo anticuerpo-antígeno. La actividad fosfatasa alcalina se reveló agregando $\approx 150 \mu\text{L}/\text{pozo}$ de una solución de PNPP (p-nitrofenilfosfato 100 mg/mL) diluido en amortiguador Tris-HCl 0.2 M (1:5). Se incubó

por 30 min. a temperatura ambiente, colocando la placa en oscuridad. La densidad óptica (DO) se midió en un aparato Multiskan EX con filtro de 405 nm. Se realizó una curva estándar con las vitelogeninas purificadas y se realizó una regresión lineal con el fin de evaluar la relación entre la DO y la cantidad de vitelogeninas purificadas. Todas las determinaciones para la calibración de la curva estándar y las muestras de los tejidos se hicieron por cuadruplicado.

6.10 RIA (Radioimmunoassay).

El Radioinmunoanálisis es una técnica potente que combina la especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo con la sensibilidad de la detección radioisotópica. El principio del RIA es muy sencillo, se establece competencia de una cantidad conocida de antígeno marcado radiactivamente y una cantidad no conocida del mismo antígeno sin marcar con una cantidad limitada estándar del anticuerpo. En consecuencia, la cantidad de radioactividad presente en la prueba es inversamente proporcional a la cantidad de hormona en la muestra de suero. Para determinar el porcentaje de hormona unida, se incuba el anticuerpo y el antígeno marcado, junto con una alícuota del material biológico que contiene una cantidad desconocida de la hormona. El antígeno sin marcar de esta alícuota diluye la radioactividad unida en una cantidad proporcional al antígeno no radioactivo presente. Se utiliza la curva estándar para determinar esa cantidad cuantitativamente (Yalow, 1978; Barrett, 1985; Mathews y Van Holde, 1998).

Pre-extracción: De una solución estándar (T o E₂, 200 ng/mL) se tomaron 100 µL, se diluyeron en 900 mL de amortiguador SAB (Na₂HPO₄ 0.05 M, NaH₂PO₄·H₂O

0.05 M, Sodio ácido 0.02%, Gelatina 0.1%, pH 7.6). Se preparó una serie de diluciones estándar y se almacenaron en refrigeración hasta su posterior uso.

Tubo	SAB (μL)	Estándar (μL)	Concentración (pg/50 μL)
A	900	100	1000
B	400	400 de A	500
C	400	400 de B	250
D	600	400 de C	100
E	100	400 de D	80
F	250	250 de E	40
G	250	250 de F	20
H	250	250 de G	10
I	250	250 de H	5
J	250	250 de I	2.5
K	250	250 de J	1.25

Se tomaron 100 μL de suero de cada una de las hembras capturadas y se colocaron individualmente en tubos de ensayo (tubos muestra), donde se mantuvieron en baño de hielo. Se preparó una solución control mezclando tres muestras de suero (10 μL c/u) de las hembras capturadas y diluidas en 2,980 μL SAB. Se prepararon cinco tubos control en baño de hielo.

Tubo (x2)	SAB (μL)	Solución Control (μL)	Estándar (μL)
SB (solvente vacío)	100	---	---
C (control)	50	50	---
C40 (control + 40 pg)	---	50	50 de F
C100 (control + 100 pg)	---	50	50 de D
C250 (control + 250 pg)	---	50	50 de C

Con una pipeta de repetición, se agregaron 50 μL de amortiguador RT (Sol. $^3\text{H-T}$ o $^3\text{H-E}_2$ 1500 dpm/50 μL diluido en SAB) a los tubos control, tubos muestra y a dos viales de centelleo marcados como TRC (conteo de recuperación total). Los tubos control y muestra se cubrieron con parafilm y se agitaron en un vortex múltiple

mediante 30 pulsaciones cortas a alta velocidad. Se dejaron los tubos en incubación a temperatura ambiente por 45 min., con la finalidad de permitir un equilibrio entre el suero y el amortiguador. En dos viales de centelleo marcados como RB (vacío) se agregaron 50 μ L de SAB. Los viales TRC y RB se taparon y almacenaron a temperatura ambiente.

Extracción: A cada tubo muestra y control se agregó 1.5 mL de solvente de extracción hexanol-acetato de etilo (70-30%). Se agitó en un vortex múltiple a velocidad media durante 1 min. Esto con la finalidad de transferir el esteroide (T o E₂) al solvente. Se centrifugaron los tubos por 15 s en una Serofuga y se guardaron a -80 °C por 15 min. El sobrenadante se decantó en tubos nuevos. El exceso de solvente se evaporó con nitrógeno por aproximadamente 10 min. en baño María (40 °C). Se agregó 0.3 mL de solvente y se repitió el proceso de secado. El esteroide (T o E₂) se resuspendió en un volumen de 300 μ L de SAB. Se taparon los tubos y se agitaron a baja velocidad durante 1 min.

Incubación: Se incubaron los tubos a 40 °C en baño María por 1 h. Se removieron los tubos del baño y se agitaron suavemente en forma circular con la mano. Se centrifugaron por 5 min. en una Serofuga con la finalidad de forzar al condensado a bajar. Se agitaron en un vortex a baja velocidad por 30 s. Se tomaron 100 μ L de cada tubo muestra y control y se colocaron en tubos de ensayo limpios. Con la finalidad de determinar el estimado de pérdida o error, ocurrido durante el proceso de extracción, se tomaron 50 μ L de cada extracción. Se colocaron en viales (por duplicado) marcados como TRC, RB, SB, C, C40, C100, C250 y muestra y se les agregó 5 mL de cóctel de centelleo (0.06% w/v 2,5-difeniloxazol y 0.01% w/v bis-2-(5-feniloxazol) benceno en tolueno:Triton X-114 (1:3)). Se taparon y se agitaron por 10 min. Se almacenaron a

temperatura ambiente hasta el día de lectura. Se preparó una curva estándar de la siguiente manera:

Tubo (x2)	SAB (μL)	Estándar (μL)
TC (Conteo total)	625	----
NSB (Uniones no específicas)	125	----
Ø (cero)	100	----
K-B (curva estándar)	50	50 de K-B

A los tubos de ensayo que contenían 100 μL de extracto se les adicionaron 25 μL de anticuerpo (T o E₂) a una dilución 1:23,000 y 1:17,000, respectivamente, con excepción de los tubos TC y NSB. Se adicionaron 25 μL de amortiguador ST (Sol. ³H-T o ³H-E₂ 10,000 dpm/250 μL diluido en SAB). Se cubrieron los tubos con parafilm y se agitaron en vortex a alta velocidad en lapsos de 30 pulsos cortos y se dejaron en incubación toda la noche (máximo 16 h) a 4 °C.

Carbón activado: Con la finalidad de eliminar las uniones no específicas, a los tubos de ensayo, excepto TC, se les agregaron 500 μL de suspensión de carbón activado-dextrán (0.05% w/v dextran, 0.5% w/v carbón activado disuelto en SAB), previamente agitado en cuarto frío por 30 min. Los tubos se taparon con parafilm y se dejaron en reposo durante 9 min. Posteriormente, se agitaron en vortex en lapsos de 10 pulsaciones cortas a alta velocidad. Se colocaron los tubos en camisas de centrifuga Sorval y se centrifugaron en un rotor HS4 a 4 °C por 9 min. a 5000 rpm. Al inicio de la centrifugación se comenzó un conteo regresivo de 25 min. El sobrenadante se colocó en viales de centelleo de 7 mL y se les adicionó 5 mL de cóctel de centelleo y se agitaron por 10 min.

Lectura: Los viales de las secciones *incubación* y *carbón activado*, se colocaron en un aparato Beckman LS6000SC y se llevó a cabo la lectura con intervalos de 5 min.

entre cada vial. Los valores obtenidos fueron analizados con el software Beckman ImmunoFit EIA/RIA analysis, versión 3.00.

6.11 Análisis Estadísticos.

Todos los valores obtenidos del nivel de concentración de vitelinas y esteroides están expresados como la media \pm error estándar (E.S.) Todos los datos fueron transformados a \log_{10} para normalizarlos (Zar, 1999). Un valor de $P < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativos y valores de P entre 0.05 y 0.1 fueron considerados como efectos marginales. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software STATISTICA versión 5.5, usando la sección GLM (General Linear Model). Se realizaron los siguientes análisis:

- A) Una regresión lineal (Daniel, 1995) entre las variables independientes: peso corporal y longitud total.
- B) Un análisis de varianzas de una vía (ANOVA) para cada una de las siguientes variables independientes: fecha de muestreo, estadio de desarrollo gonadal, peso corporal, fotoperíodo, temperatura y salinidad para conocer el efecto de estas variables sobre los diferentes niveles de vitelinas y esteroides. Seguido de una comparación de medias donde se usó una prueba de Tukey-Kramer (Zar, 1999).
- C) Un análisis de covarianza (ANCOVA) en donde se considero como covariable el peso corporal de cada hembra. Las variables dependientes en los dos análisis fueron los diferentes niveles de vitelinas y esteroides. Las variables independientes fueron las mismas empleadas en el ANOVA. Seguido a este análisis se realizó una comparación de medias (mediante la función Least square del programa Statistica). Los resultados de este análisis se presentan como medias ajustadas a la covariable.

7. RESULTADOS.

7.1 Purificación de Vitelogeninas en Sangre.

7.1.1 Estimulación a la Síntesis de Vitelogenina.

El suero obtenido de las hembras previo (H_1 , H_2 , H_3) y posterior a la estimulación con E_2 (H_{1E} , H_{2E} , H_{3E}) se sometió a un análisis inmunoenzimático ELISA, con el fin de evaluar de manera cualitativa la presencia de VTG en sangre. Los anticuerpos utilizados están dirigidos contra las vitelinas del ovario de *P. californicus* (AcVtpc) y han sido preparados en un trabajo anterior (Burgos-Aceves, 2001). Se detectó una reacción positiva importante en la sangre H_{1E} , H_{2E} , H_{3E} a los ocho días posteriores al estímulo. En la sangre H_1 , H_2 , H_3 no se detectó presencia de VTG (Fig. 9).

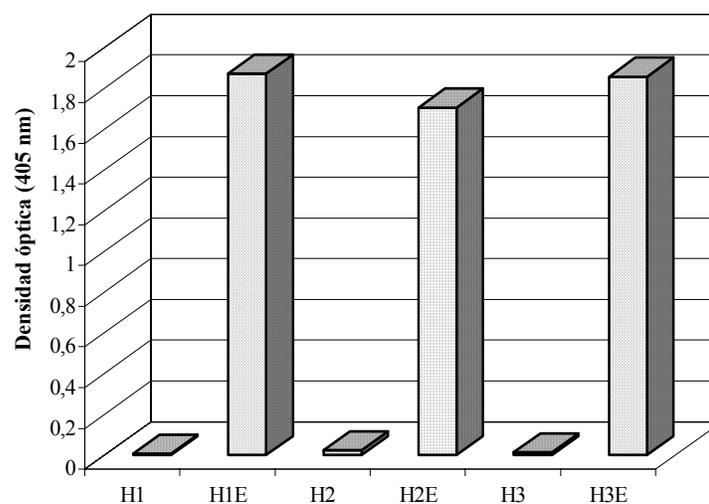


Figura 9. Respuesta a la inducción de vitelogénesis en hembras silvestres inmaduras de *P. californicus*. (H_1 , H_2 , y H_3) Muestras de sangre de las hembras inmaduras previo a la estimulación con E_2 . (H_{1E} , H_{2E} y H_{3E}) Muestras de sangre de hembras inmaduras posterior a la estimulación con E_2 . Dosis suministrada: 5 mg de E_2 por Kilogramo de peso húmedo del ejemplar.

Dichos resultados se corroboraron mediante una electroforesis PAGE-Nativa, en un gel de poliacrilamida continuo al 6%. En el suero de las hembras posterior a la

estimulación (Fig. 10 B, D y E) se observan dos fracciones proteínicas inexistentes en el suero de las hembras previo a la estimulación (Fig. 10 A, C, F).

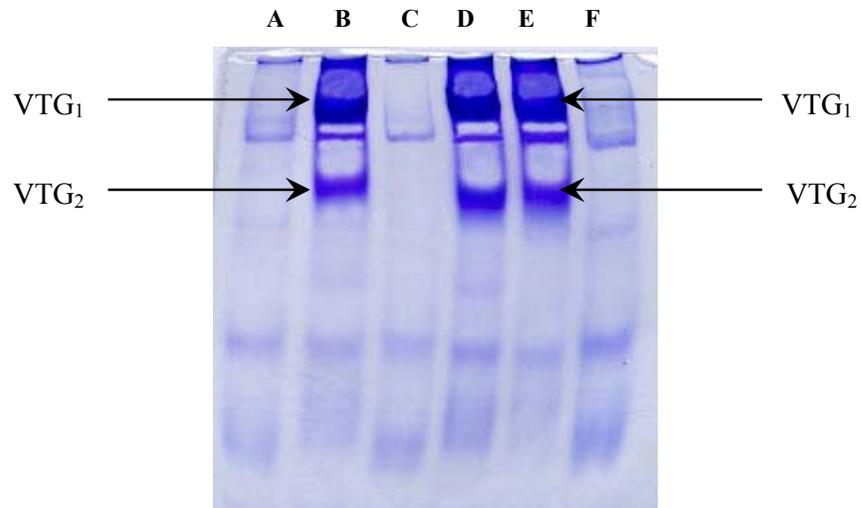


Figura 10. Electroforesis PAGE-Nativa en gel continuo de poliacrilamida 6%. (A, C, F) Suero de hembra inmadura previo a la inyección con 17β -estradiol; (B, D, E) Suero de hembra inmadura posterior a la inyección con 17β -estradiol

7.1.2 Purificación.

Los resultados obtenidos a partir del proceso de purificación del suero de una de las hembras estimuladas (H_{1E}) analizado por cromatografía (columna de DEAE Sepharose CL-6B) mostraron cuatro picos importantes (Fig. 11), los cuales fueron concentrados en membranas amicon (tamaño de del poro 10,000 Da).

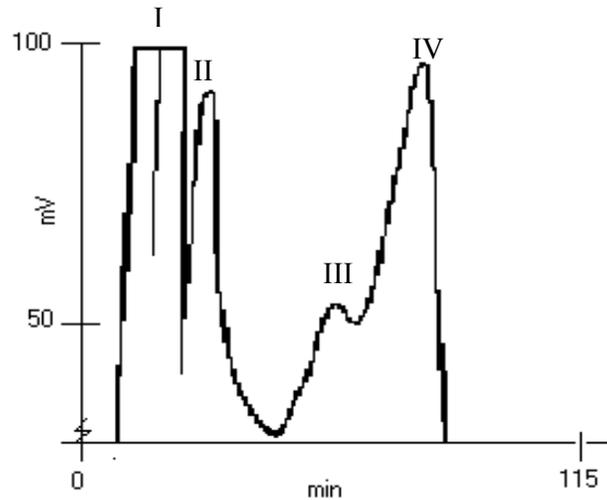


Figura 11 Perfil de elución del suero de hembra inmadura de *P. californicus* corrido en columna de DEAE Sepharose CL-6B equilibradas con 150-300 mM de TRIS-HCl. Pico IV) VTG's aisladas totalmente del resto del paquete proteínico.

A partir de la electroforesis PAGE-Nativa realizada se obtuvo que fue en el pico número IV donde se determinó la presencia de dos tipos de VTG (Fig. 12 b), ausente en la sangre de la hembra previa a la estimulación. Dichas moléculas de naturaleza proteínicas (Fig. 12 a), glucídicas (Fig. 12 b) y lipídicas (Fig. 12 c) presentaron pesos moleculares aproximados de 550 kDa (VTG₁) y 380 kDa (VTG₂).

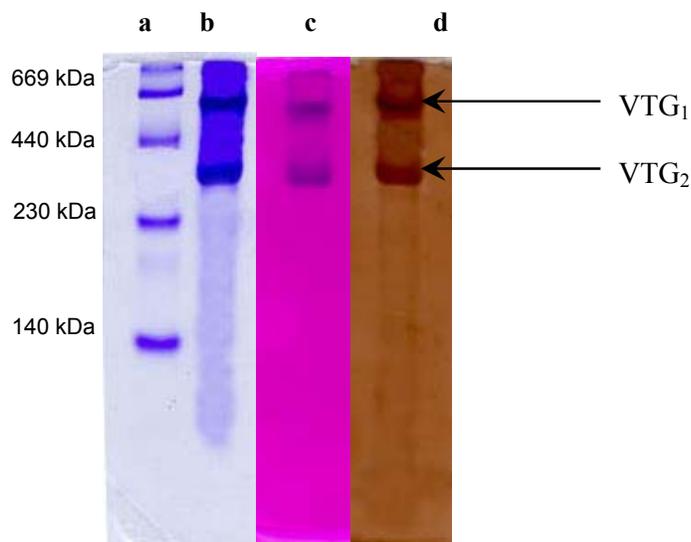


Figura 12. Electroforesis PAGE-Nativa en gel de poliacrilamida al 6% del pico IV. a) Marcador con pesos moleculares predeterminados; b) Pico IV teñido con azul de Coomassie R-250; c) Pico IV teñido con reactivo de Schiff's; d) Pico IV teñido con Sudán Negro.

7.2 Titulación de los Anticuerpos Anti-vitelina para *P. californicus*.

Mediante una saturación progresiva del reactivo específico (anticuerpos) por medio del antígeno marcado, se determinó la aptitud del reactivo (anticuerpo) para fijar lo más posible el compuesto que se cuantificó, en este caso fue VTG. Partiendo del supuesto que la unión de antígeno con anticuerpo sea una combinación firme pero dissociable; donde dicha formación de agregados o conglomerados consiste en la disociación y recombinación de dichas moléculas entre sí hasta que se forma una red razonablemente estable de moléculas de antígeno y anticuerpo (Barrett, 1985), se evidenciaron tres zonas (Fig. 13):

- (I) Exceso de anticuerpo (prozona): Ocurre una saturación incompleta de los mismos. No se observa agregación porque al disociarse el anticuerpo del antígeno hay mayor probabilidad de que una de las moléculas libres de anticuerpo se combine con la molécula original de antígeno que el anticuerpo ya fijado a una molécula antigénica.
- (II) Zona de equivalencia (punto de equidad): Se logra un equilibrio de la reacción antígeno-anticuerpo. Dicho punto de equivalencia, está dado en función a la utilización de todas las moléculas de antígenos y anticuerpos, en la formación de la red.
- (III) Exceso de antígenos (poszona): Ocurre, en esencia, una situación opuesta a la prozona, donde el anticuerpo es muy poco y no produce una reacción completa.

Por otro lado, se constataron en los ensayos de titulación que las diluciones 1:30,000 son todavía reactivas, lo que evidencia así una buena afinidad por parte de los AcVtpc.

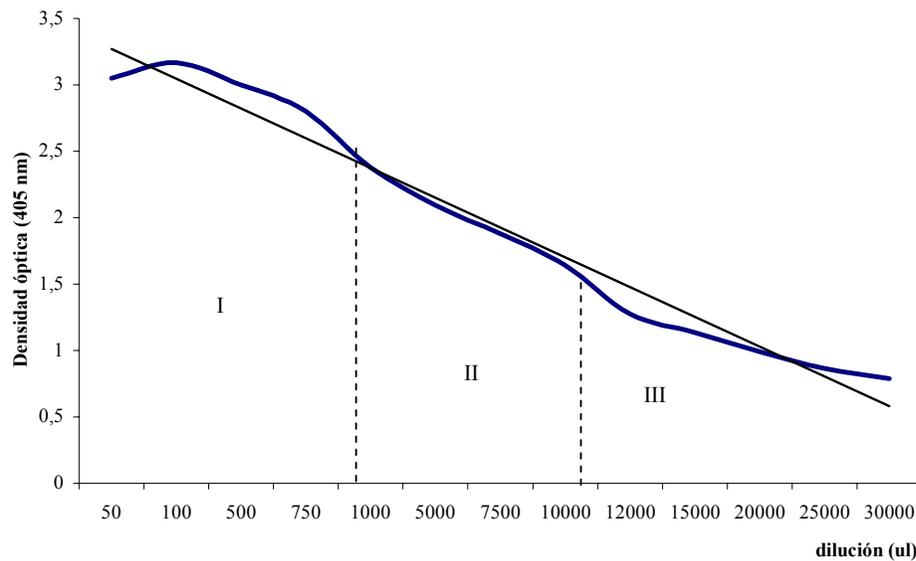


Figura 13. Curva de titulación de anticuerpos anti-vitela del *P. californicus*, (1) exceso de anticuerpos; (2) equilibrio antígeno-anticuerpo; (3) exceso de antígenos.

7.3 Especificidad de los Anticuerpos AcVtpc.

Los resultados obtenidos a partir de la técnica de doble inmunodifusión, demuestran la presencia de un arco continuo de precipitación insoluble lo que señala una identidad inmunológica completa entre los AcVtpc y los diferentes tejidos analizados: sangre (Fig. 14 a), hígado (Fig. 14 b), ovario (Fig. 14 c), así como en huevo (Fig. 14 d). No se verificó una reacción de precipitación insoluble entre los AcVtpc y sangre (Fig. 14 f) e hígado de macho (Fig. 14 e). La formación de una sola línea de precipitado entre un antígeno y su correspondiente anti-suero puede ser utilizada como una evaluación cualitativa de la pureza del anticuerpo.

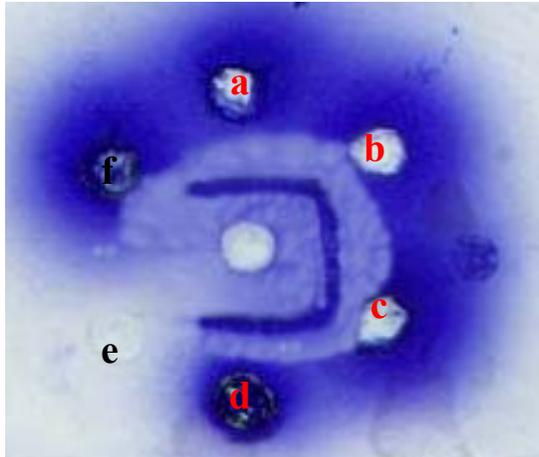


Figura 14. Doble inmunodifusión con varios antígenos (a) Sangre de hembra; (b) Hígado de hembra; (c) Ovario (d) Huevo (e) Hígado de macho; (f) Sangre de macho;

Los resultados obtenidos a partir del análisis de Western Blot (Fig. 15), mostraron que los AcVtpc, preparados a partir de extracto de ovario, reconocen siete subunidades correspondiente a las VTG's en sangre de hembra inmadura inducida (Fig. 15 B).

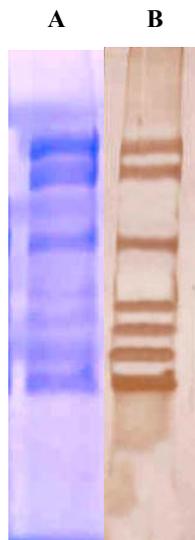


Figura 15. Determinación de especificidad de los AcVtpc mediante la técnica de Western Blot. (A) Electroforesis en PAGE-SDS de sangre de hembra inmadura inyectada con E_2 ; (B) Membrana Immobilon-P tamaño de poro 0.45 μm .

7.4 Estandarización de ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

Mediante una serie de diluciones de vitelinas (0.1-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PT) presentes en los tejidos (ovario, hígado, sangre) implicados en el proceso de vitelogénesis se obtuvo una curva linearizada (Fig. 16). Dicho paralelismo entre las curvas señala que de los AcVtpc reconocen de manera específica moléculas de VTG en suero e hígado y LVT en ovario, determinando así la habilidad de reconocimiento de los AcVtpc.

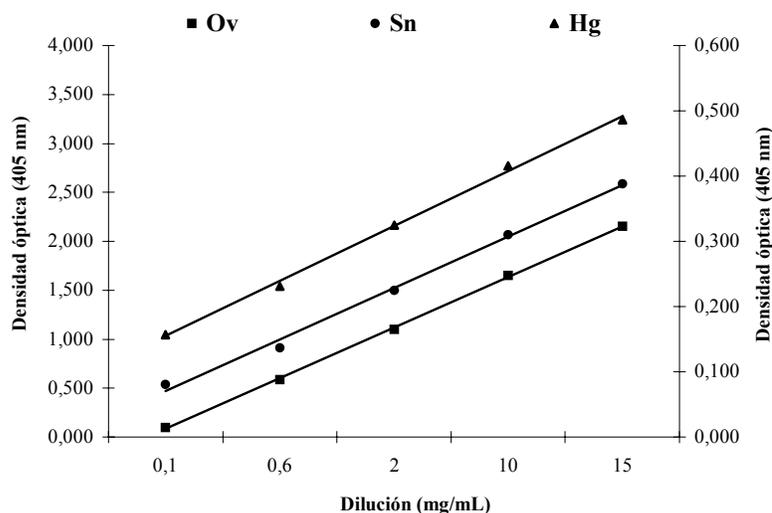


Figura 16. Curvas paralelas transformadas obtenidas a partir de diluciones seriales de (●) sangre; (■) ovario; (▲) hígado. La pendiente de las curvas de regresión lineal (Sangre $y = 0.526x - 0.056$, $r^2 = 0.99$; Ovario $y = 0.516x - 0.43$, $r^2 = 0.99$; Hígado $y = 0.0843x + 0.0703$, $r^2 = 0.997$) no presentaron diferencia significativa entre ellas (análisis de covarianza).

Utilizando una serie de diluciones (20-800 ng/mL) que partían de una concentración inicial de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y una dilución del AcVtpc 1:3000, se calibró una curva estándar utilizando VTG purificada. A partir de estas diluciones, el valor máximo de densidad óptica fue de alrededor de 2.0 (Fig. 17). La cantidad mínima de VTG que produjo una respuesta significativa se estimó de alrededor de 2 ng/mL .

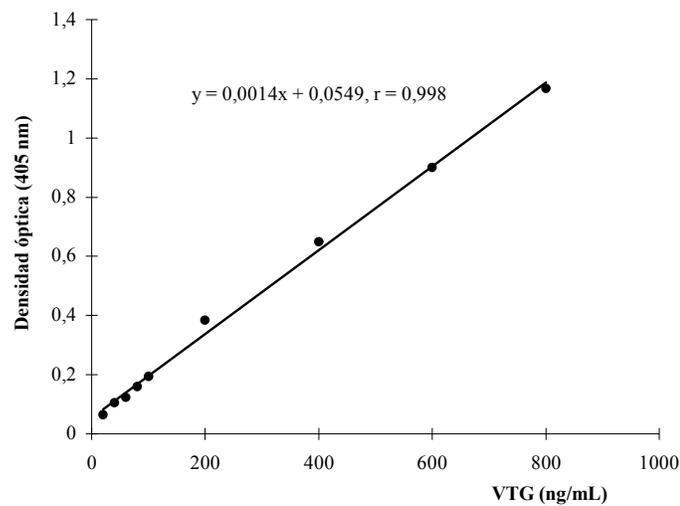


Figura 17. Curva estándar utilizada en la cuantificación de vitelinas, en sangre, ovario e hígado del lenguado de California durante el ciclo reproductivo

7.5 Parámetros Ambientales.

Las fluctuaciones de la temperatura y la salinidad del agua en la zona de muestreo, durante el periodo de estudio, se muestran en la Fig. 18 a. La temperatura del agua, al inicio del muestreo, fue de 20 °C durante el mes de diciembre de 2001, y se mantuvo hasta febrero de 2002. Gradualmente hubo un descenso en la temperatura hasta bajar a un promedio de 15 °C para el mes de abril. Posteriormente se fue incrementando gradualmente hasta llegar nuevamente a los 20 °C para el mes de agosto. La salinidad del agua en la zona de muestreo presentó un intervalo de entre 35-37 ppm \pm 0.9.

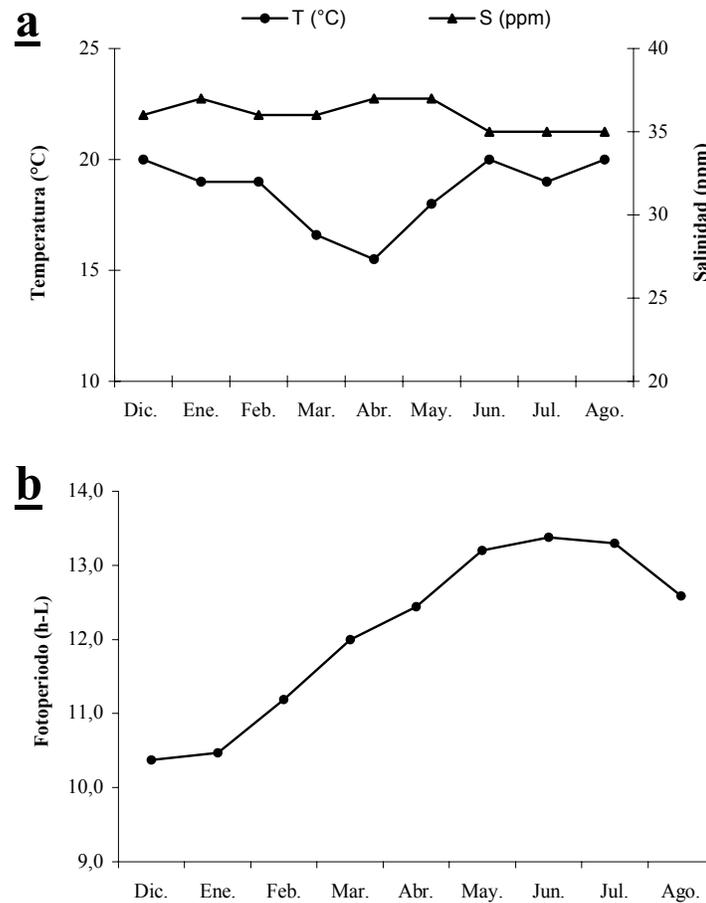


Figura 18. Patrón de (a) Temperatura (°C) y Salinidad (ppm); (b) Fotoperiodo durante el periodo de estudio (de diciembre de 2001 a agosto de 2002)

El fotoperiodo para el mes de diciembre y los dos subsecuentes meses fue corto, por debajo de las 12 horas-luz (h-L) al día. Durante el tiempo de muestreo las h-L fueron incrementando gradualmente a partir del mes de marzo, lo que se mantuvo por periodos prolongados (por arriba de 12 h-L) hasta el mes de agosto (Fig. 18 b).

7.6 Variables Morfométricas de los Animales Estudiados.

Un total de 82 hembras de *P. californicus* fueron pescados en la zona de Bahía Magdalena durante un periodo de nueve meses, con un peso promedio de 1.2 ± 0.09 Kg. (0.5-1.8 Kg.) y una talla promedio de 46.3 ± 1.88 cm. (36-56 cm). No se observaron diferencias significativas entre las medias de los pesos y tallas (Tabla IV) de las hembras con relación al mes de captura.

Tabla IV. Variables morfométricas de hembras silvestres de lenguado de California capturadas en Bahía Magdalena, B.C.S., México. Media \pm error estándar.

Muestreo	No. de ejemplares	Longitud promedio (cm)	Peso promedio (Kg)
Diciembre	10	42 \pm 6.48	0,91 \pm 0.39
Enero	10	46,1 \pm 4.79	1,1 \pm 0.28
Febrero	9	46,3 \pm 3.74	1,1 \pm 0.24
Marzo	10	46,3 \pm 4.43	1,2 \pm 0.28
Abril	8	46,1 \pm 3.3	1,1 \pm 0.19
Mayo	2	45,5 \pm 7.7	1,1 \pm 0.28
Junio	13	47,8 \pm 5.17	1,2 \pm 0.29
Julio	10	49,7 \pm 4.29	1,2 \pm 0.27
Agosto	10	46,5 \pm 5.85	1,1 \pm 0.39
Total	82	46,3 \pm 1.88	1,2 \pm 0.09
ANOVA		P = 0,48	P = 0,80

Al considerar los resultados del análisis de regresión lineal (Daniel, 1995), realizado entre los valores de peso y talla de cada hembra, se observó una relación entre estas dos variables (Fig. 19), lo que nos permite estimar mediante la ecuación obtenida $y = 15.059x + 29.529$, las posibles tallas que se observarán a partir de un peso dado. Dicho análisis mostró que las dos variables están altamente correlacionadas ($r = 0.91$) en el intervalo de tamaños muestreados.

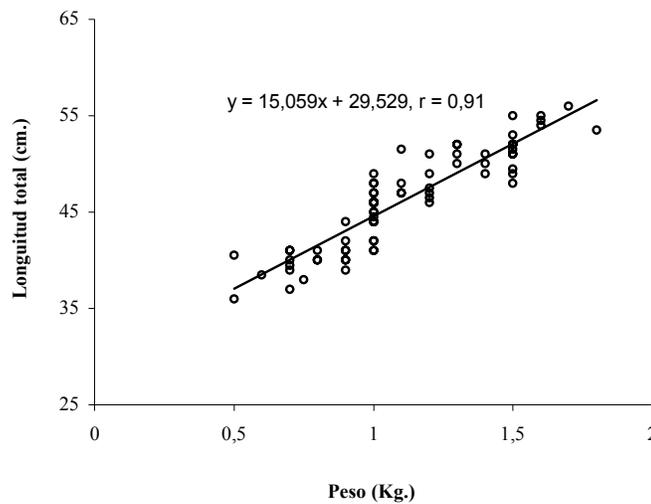


Figura 19. Análisis de regresión lineal efectuado entre los valores obtenidos de peso y talla de las hembras silvestres capturadas, presentando un $r = 0,91$

7.7 Clasificación Histológica de Gónadas de *P. californicus*.

En función a la observación microscópica de 1110 laminillas de cortes histológicos de tejido gonádico de las 82 hembras capturadas se establecieron ocho estadios gonádicos, englobados en 5 fases de desarrollo gonadal para hembras silvestres del lenguado de California (Tabla V). Dichos estadios fueron descritos, con base en Wallace y Selman (1981), De Vlaming (1983) y Tyler y Sumpter (1996). Los resultados del análisis sugiere que se trata de una especie con un desarrollo gonádico de tipo asincrónico, en relación con la presencia de ovocitos en diferentes estadios de desarrollo, sin una población dominante (Wallace y Selman, 1981; De Vlaming, 1983).

Dentro de la primera fase de crecimiento (inmaduro) se establecieron dos estadios de desarrollo gonadal, independientes de gonadotropinas: (a) Estadio I, *peri-núcleo temprano* (30-70 μm), contiene ovocitos inmaduros con un citoplasma fuertemente

basofílico (Fig. 20 A), rodeados por células foliculares; (b) Estadio II, *peri-núcleo tardío* (63-140 μm), contiene ovocitos con un citoplasma menos basofílico debido a la presencia de ribonucleoproteínas rodeadas por organelos citoplasmáticos (Wallace y Selman, 1981; Tyler y Sumpter, 1996); se observa la presencia de esferas translúcidas en la periferia del citoplasma que pueden ser gotas lipídicas y/o algunos alvéolos corticales. El núcleo o vesícula germinal (VG) se incrementa en tamaño y los nucleolos se sitúan en la periferia (Fig. 20 B).

Dentro de la segunda fase de crecimiento (inicio de maduración), dependiente de gonadotropinas, se estableció el estadio III, *alvéolo cortical* (152-240 μm). Contiene material citoplasmático ligeramente basofílico, se observa la presencia de estructuras de mucopolisacáridos, alvéolos corticales, (AA-positivo) los cuales presentan una coloración azul con la técnica de Azul Alsiario-PAS. Al inicio de este estadio tales estructuras aparecen en el centro del citoplasma y conforme incrementan su tamaño y número se van moviendo hacia la periferia dentro del citoplasma. Se observan abundantes gotas lipídicas cerca del núcleo. Subsecuentemente con la presencia de los alvéolos corticales, aparecen pequeños glóbulos de vitelo, esféricos y basofílicos, lo cual marca la iniciación de la vitelogénesis (Fig. 20 C, D).

En la tercera fase (madurando) se engloban dos estadios: (a) Estadio IV, *vitelogénesis temprana* (212-345 μm), los glóbulos de vitelo incrementan en número y tamaño, distribuyéndose por todo el citoplasma, y frecuentemente se fusionan unos con otros de manera centrípeta. Los glóbulos de vitelo son ahora ligeramente acidófilos. El tamaño del ovocito incrementa considerablemente (Fig. 20 D; 22 A); (b) Estadio V,

vitelogénesis tardía (280-402 μm), tanto el tamaño del ovocito como el de los glóbulos de vitelo dentro del citoplasma incrementan en tamaño debido a la fusión de los mismos, lo cual da origen a dos tipos de proteínas, fosfoproteínas y lipoproteínas (Fig. 21 A, B, 22 A). Los alvéolos corticales presentan el mismo tamaño, número y distribución durante todo el proceso de vitelogénesis.

En la fase cuatro (maduro) se estableció al (a) Estadio VI, *migración de la vesícula germinal* (MVG) (325-473 μm), el núcleo se desplaza progresivamente hacia el polo animal donde está localizado el micropili (Fig. 22 B, C, D); (b) Estadio VII, *maduración final* (315-657 μm), hay un rompimiento de la membrana nuclear. El resultado de la coalición de los glóbulos de vitelo es la formación de una masa lipídica llamada vitelo (Vt). Se observa un alargamiento del ovocito debido a una marcada hidratación y presenta una forma translúcida (Fig. 23 A, B).

Por último, dentro de la fase cinco (reabsorción), el estadio VIII, *foliculo post-ovulatorio* (144-377 μm), está caracterizado por un lumen folicular grande (Fig. 24 A, B). Histológicamente, el foliculo post-ovulatorio conforme se va degenerando se vuelve indistinguible del tejido conectivo. Dentro de cada uno de los estadios de desarrollo se observó la presencia de ovogonias ($10\text{-}25 \mu\text{m} \pm 2.5$) en las gónadas estudiadas.

Tabla V. Estadios de maduración gonadal de hembras capturadas del lenguado de California. La apariencia de los ovocitos, intervalo y diámetro promedio (\pm error estándar) del ovocito, representan el estadio de desarrollo más avanzado en el ovario.

Fase	Estadio	Descripción	Diámetro (μm)
1. Inmaduro	I. <i>Peri-núcleo temprano</i>	Citoplasma fuertemente basofílico. Incremento en el tamaño del núcleo.	30-70 53 \pm 0.9
	II. <i>Peri-núcleo tardío</i>	Citoplasma menos basofílico. Presencia de gotas lipídicas. Nucleolos situados en la periferia del núcleo.	63-140 96 \pm 1.5
2. Inicio maduración	III. <i>Alvéolo cortical</i>	Alvéolos corticales situados en la periferia del citoplasma. Presencia abundante de gotas lipídicas.	152-240 201 \pm 1.8
3. Madurando	IV. <i>Vitelogénesis temprana</i>	Comienza la inclusión de glóbulos de vitelo. Incremento marcado de tamaño del ovocito.	212-345 271 \pm 2.4
	V. <i>Vitelogénesis tardía</i>	El ovocito incrementa en tamaño y los glóbulos de vitelo se van fusionando.	280-402 335 \pm 2.6
4. Maduro	VI. <i>Migración vesícula germinal</i>	La VG migra hacia el polo animal progresivamente.	325-473 387 \pm 6.5
	VII. <i>Maduración final</i>	Rompimiento de la vesícula germinal. Formación de vitelo. Hidratación.	315-657 483 \pm 9.1
5. Reabsorción	VIII. <i>Post-ovulatorio</i>	Folículos post-ovulatorios caracterizados por un lumen folicular grande y en reabsorción.	144-377 232 \pm 7.8

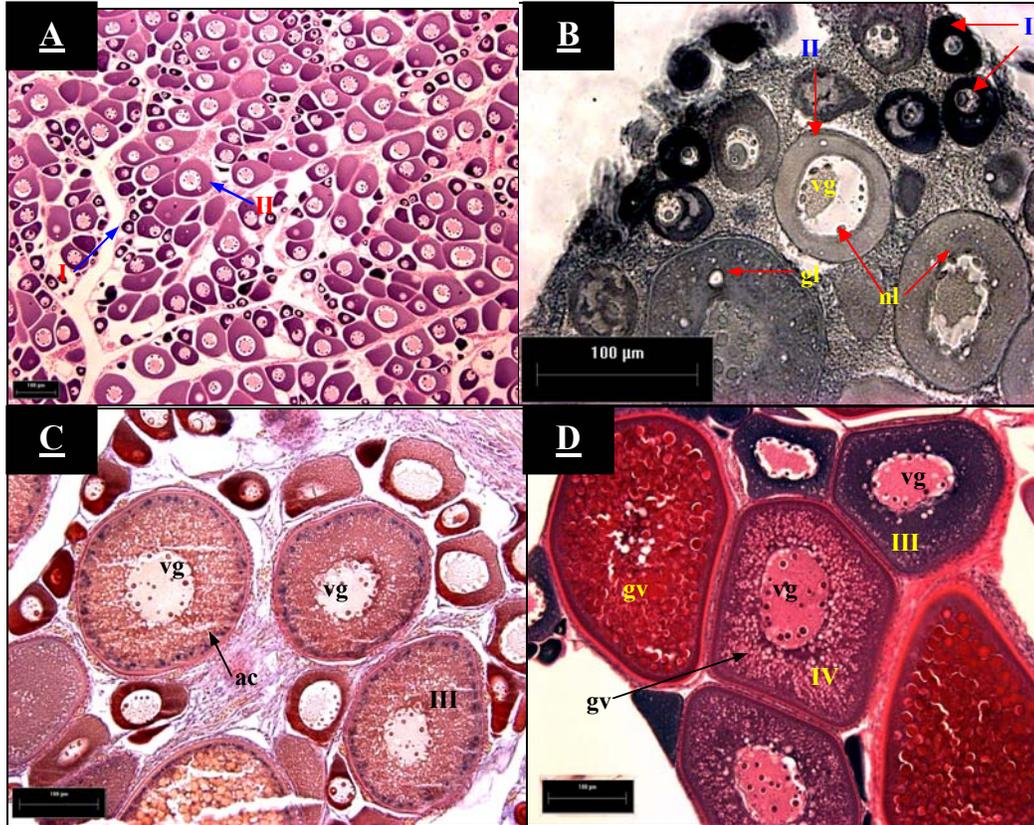


Figura 20. Foto-micrografía de los estadios de desarrollo gonadal descritos, para hembras silvestres del lenguado de California, en este estudio. A) Estadios Peri-núcleo Temprano (I) y Peri-núcleo Tardío (II) en tinción de Hematoxilina-Eosina (10x); B) Estadios I y II en tinción Sudán Negro (40x); C) Estadios I, II y alvéolo cortical (III), AA+, en tinción de Azul Alsiانو-PAS (20x); D) Estadios II, III y Vitelogénesis temprana (IV) en tinción de Hematoxilina-Eosina (20x). vg) Núcleo o Vesícula germinal, nl) Nucleolo, gl) Gotas lipídicas, ac) Alvéolo cortical, gv) Glóbulos de vitelo. Barra escala 100 µm.

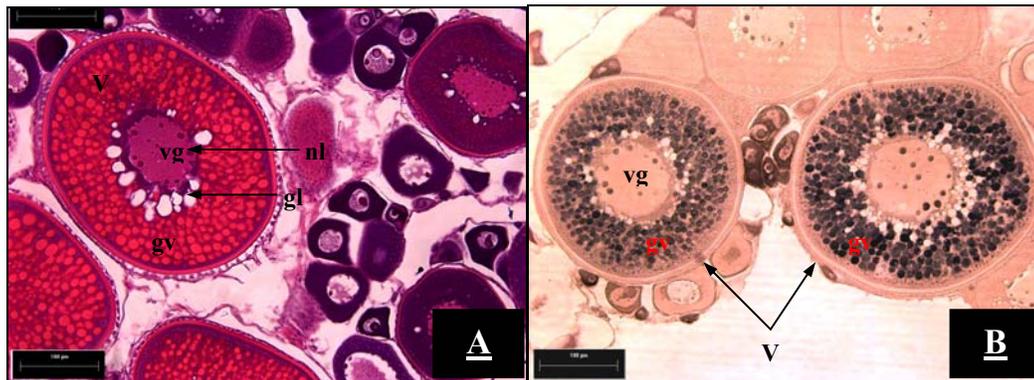


Figura 21. Foto-micrografía de los estadios de desarrollo gonadal de hembras silvestres del lenguado de California, descritos en este estudio. A) Estadio Vitelogénesis Tardía (V) en tinción de Hematoxilina-Eosina (20x); B) Estadio V en tinción de Sudán Negro (20x). vg) Núcleo o Vesícula germinal, nl) Nucleolo, gl) Gotas lipídicas, gv) Glóbulos de vitelo. Barra escala 100 µm.

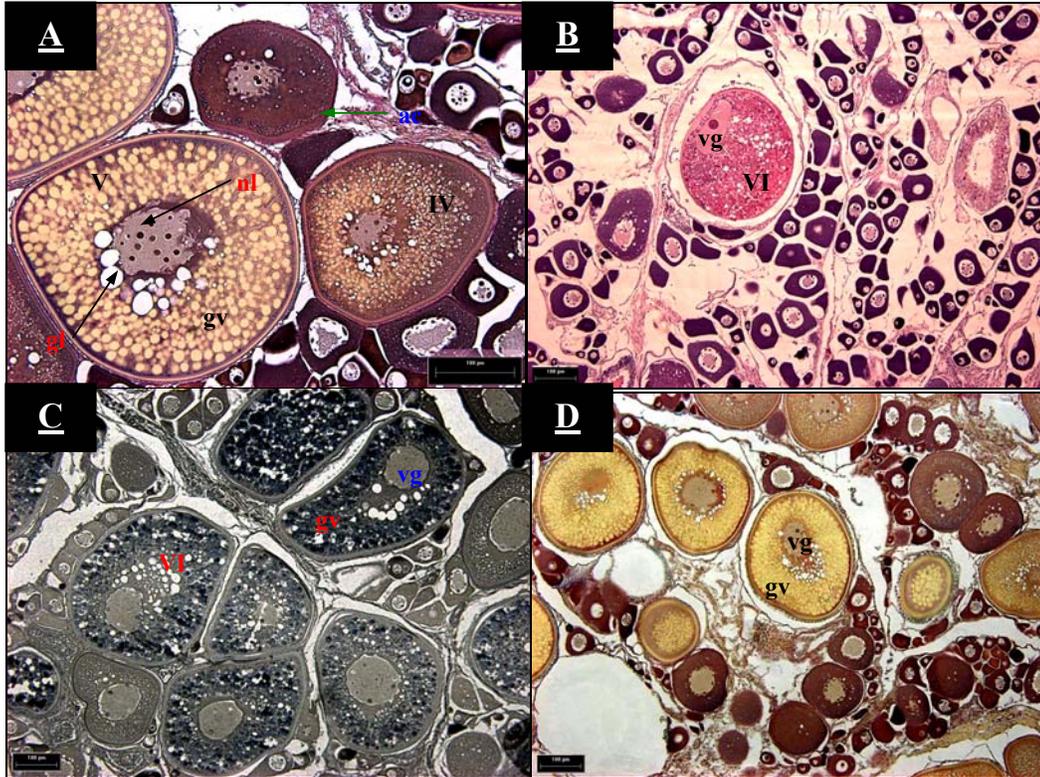


Figura 22. Foto-micrografía de los estadios de desarrollo gonadal de hembras silvestres del lenguado de California descritos en este estudio. A) Estadios IV y V en tinción Azul Alciano-PAS (20x); B) Estadio Migración de la Vesícula Germinal (VI) en tinción de Hematoxilina-Eosina (10x); C) Estadio VI en tinción Sudán Negro (10x); D) Estadio VI en tinción Azul Alciano (10x). vg Núcleo o Vesícula germinal, nl) Nucleolo, gl) Gotas lipídicas, gv) Glóbulos de vitelo. Barra escala 100 µm.

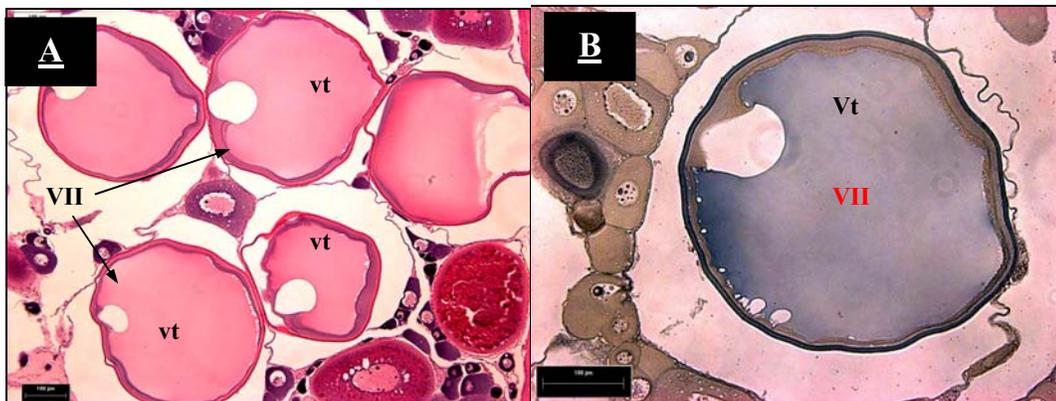


Figura 23. Foto-micrografía de los estadios de desarrollo gonadal de hembras silvestres del lenguado de California descritos en este estudio. A) Estadio VII en tinción de Hematoxilina-Eosina (10x); B) Estadio VII en tinción de Sudán Negro (20x). vt) Vitelo. Barra escala 100 µm.

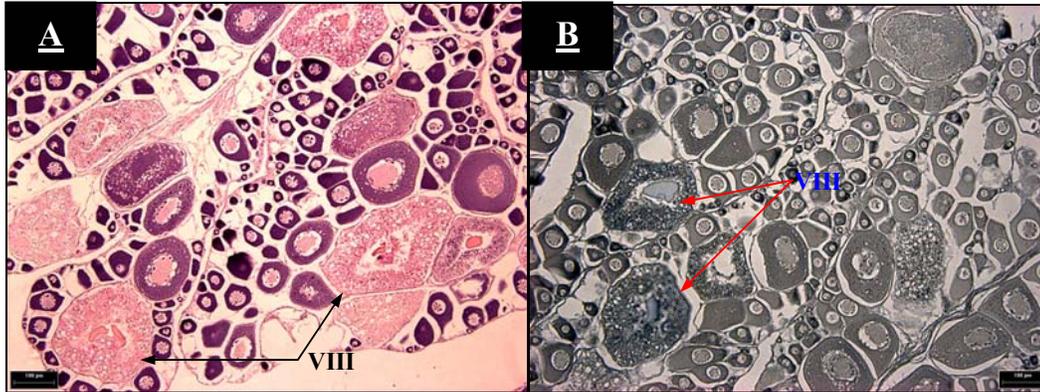


Figura 24. Foto-micrografía de los estadios de desarrollo gonadal de hembras silvestres del lenguado de California descritos en este estudio. A) Estadio Folículo Post-ovulatorio (VIII) en tinción de Hematoxilina-Eosina (10x); B) Estadio VIII en tinción de Sudán Negro (10x). Barra escala 100 µm.

7.8 Distribución de los Estadios de Desarrollo Gonadal durante la temporada de muestreo.

Durante el periodo de estudio, la frecuencia de los estadios de desarrollo gonadal con respecto al mes de captura se muestra en la figura 25. Se observaron hembras en los diferentes estadios de desarrollo gonadal con excepción del estadio IV. El mayor número de casos de hembras en estadio VII se capturaron durante los meses de enero (67%), febrero (78%), marzo (70%) y abril (63%). Hembras inmaduras (estadios I y II) se capturaron durante los meses de diciembre (60%), junio (38%), julio (20%) y agosto (50%). Las hembras con un estadio de desarrollo gonadal III se capturaron en los meses de diciembre (40%), febrero (11%), abril (25%), junio (15%), julio (20%) y agosto (15%). Tres hembras con un estadio de desarrollo gonadal V se observaron en el mes de enero (22%) y marzo (10%) sin presentar evidencia de haber desovado. Hembras en estadio VI se capturaron durante los meses de febrero (11%), marzo (10%), abril (13%), junio (15%), y julio (30%). Las hembras en estadio VIII solo se observaron en los meses de junio (23%) y agosto (20%). Por lo tanto, las hembras inmaduras predominaron al inicio y al final de la temporada de muestreo.

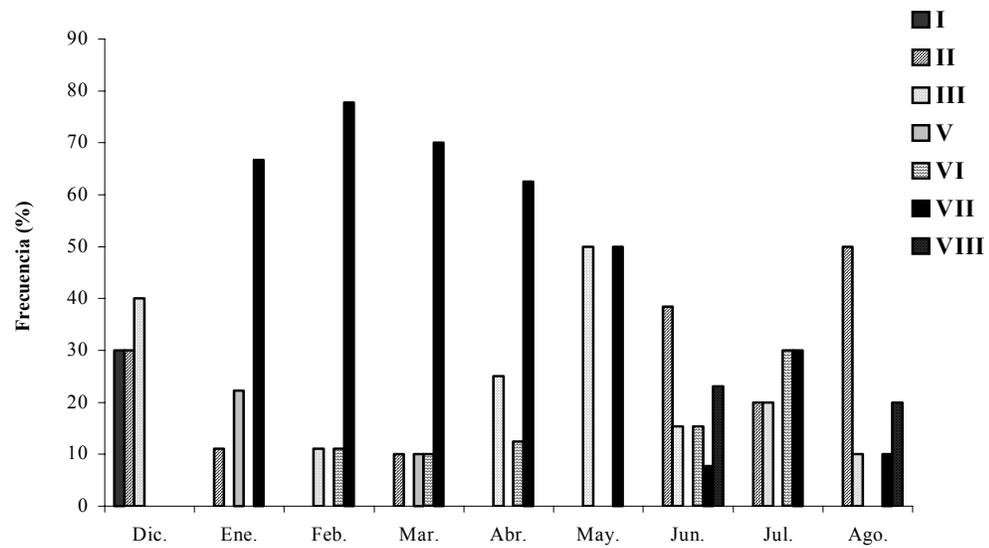


Figura 25. Frecuencia de los diferentes estadios de maduración gonadal de las hembras silvestres del lenguado de California *P. californicus*, durante la temporada de muestreo.

Por otro lado, la distribución del tamaño del ovocito durante la temporada de captura mostró una distribución semejante a la frecuencia de los estadios de desarrollo gonadal. Es durante el periodo enero-mayo (Fig. 26) donde se observaron ovocitos de diámetro mayor.

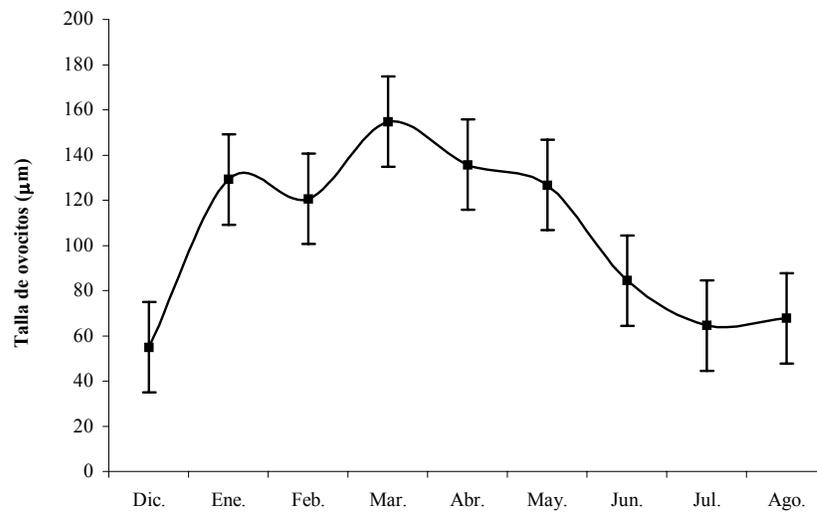


Figura 26. Distribución de talla de los ovocitos de las hembras de *P. californicus* durante la temporada de muestreo.

7.9 Evaluación de la Variación en el Nivel de Concentración de Vitelinas y Esteroides Sexuales vs. Peso Corporal.

En función a los resultados obtenidos, se observó que las hembras con PC inferiores a 1 Kg., los niveles promedio de Vtg en hígado (1.02 ng/g), LVT (2.79 ng/g), VTG (1.43 ng/mL) y E₂ (0.33 ng/mL) fueron inferiores a los observados en hembras con PC superior a 1 Kg. (Fig. 27). Presentándose así diferencias significativas entre ambos grupos (Tabla VI). Por otro lado, los niveles promedio de T en las hembras con PC inferiores a 1 Kg. fue de 0.07 ng/mL y de las hembras con mayor PC fue de 0.11 ng/mL, sin embargo, no hubo diferencias significativas (P = 0.3736) entre ambos grupos (Tabla VI).

Tabla VI. Niveles de concentración promedio (Log₁₀ ± error estándar) de vitelinas y esteroides en hembras silvestres de *P. californicus* con relación al peso corporal.

Variable	Peso (<1 kg)	Peso (>1 kg)	ANOVA
Vtg	1,02 ± 0,13 ^a	1,37 ± 0,07 ^b	P= 0,0816
VTG	1,43 ± 0,17 ^a	2,17 ± 0,09 ^b	P = 0,0003
LVT	2,79 ± 0,13 ^a	3,12 ± 0,07 ^b	P = 0,0400
E ₂	0,33 ± 0,06 ^a	0,55 ± 0,04 ^b	P = 0,0151
T	0,07 ± 0,02	0,11 ± 0,02	P = 0,3736

*Los valores con diferente superíndice presentaron diferencias significativas entre ellos

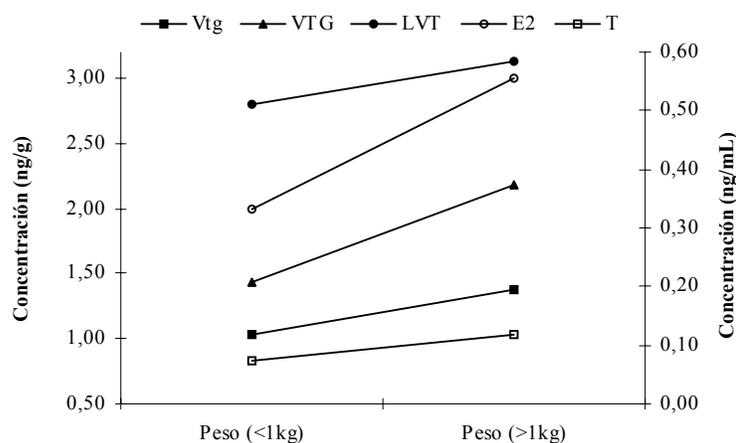


Figura 27. Variación en el nivel de concentración de (▲) VTG en sangre; (●) LVT en ovario; (■) Vtg en hígado; (○) E₂ y (◻) T en sangre de hembras silvestres del lenguado de California con relación al peso corporal.

El análisis de correlación efectuado entre la variable PC con relación a la variable Estadio de desarrollo gonadal ($P = 0.028$) mostró que existe una alta correlación entre dichas variables (Tabla VII). A su vez, se observó que existe una estrecha correlación entre el Estadio de desarrollo gonadal y los niveles de Vtg ($P = 0.0007$), LVT ($P = 0.0007$), VTG ($P = 0.0001$), E₂ ($P = 0.0003$) y T ($P = 0.0019$).

Tabla VII. Análisis de correlación entre el Peso Corporal (PC) con el estadio de desarrollo gonadal y los niveles de vitelogenina hepática (Vtg), lipovitelina (LVT), vitelogenina sanguínea (VTG), 17b-estradiol (E₂) y testosterona (T).

	Peso	Estadio	Vtg	LVT	VTG	E ₂	T
Peso		0,267*	0,139	0,144	0,335*	0,083	-0,002
Estadio	0,267*		0,647*	0,717*	0,681*	0,613*	0,409*
Vtg	0,139	0,647*		0,791*	0,732*	0,802*	0,712*
LVT	0,144	0,717*	0,791*		0,700*	0,810*	0,668*
VTG	0,335*	0,681*	0,732*	0,700*		0,692*	0,608*
E ₂	0,083	0,613*	0,802*	0,810*	0,692*		0,793*
T	-0,002	0,409*	0,712*	0,668*	0,608*	0,793*	

*Variables que presentaron correlación entre sí.

7.10 Evaluación de la Variación en el Nivel de Concentración de Vitelinas en *P. californicus* vs. Tiempo.

Los resultados obtenidos, en la cuantificación de los niveles de concentración de VTG en sangre durante el tiempo de estudio, mostraron un incremento de los niveles de concentración de VTG para el periodo enero-abril (Fig. 28), con un nivel de concentración promedio de 2.83 ng/mL ocurrido en el mes de marzo (Tabla VIII). El nivel de concentración promedio observado entre los meses de enero-abril no presenta diferencias significativas entre ellos. Un decremento en el nivel de concentración de VTG se observa a partir del mes de mayo. El nivel de concentración promedio observado en el mes de agosto fue de 1.06 ng/mL (Tabla VIII) lo que representa una diferencia significativa ($P = 0.000031$) con respecto al nivel de concentración promedio observado para el mes de marzo.

Tabla VIII. Niveles de concentración promedio ($\log_{10} \pm$ error estándar) de vitelinas en sangre, ovario e hígado de hembras silvestres de *P. californicus* durante el periodo de muestreo.

Mes	No. ejemplares	Sangre (ng/mL)	Ovario (ng/g)	Hígado (ng/g)
Diciembre	4	1,62 \pm 0,08 ^a	2,51 \pm 0,20 ^a	0,94 \pm 0,13 ^a
Enero	8	2,09 \pm 0,10 ^{ab}	3,45 \pm 0,03 ^b	1,88 \pm 0,09 ^b
Febrero	7	2,45 \pm 0,14 ^b	3,51 \pm 0,04 ^b	1,46 \pm 0,12 ^b
Marzo	9	2,83 \pm 0,06 ^b	3,45 \pm 0,02 ^b	1,75 \pm 0,09 ^b
Abril	7	2,38 \pm 0,27 ^b	3,28 \pm 0,11 ^b	1,58 \pm 0,23 ^b
Mayo	2	2,07 \pm 0,86 ^a	3,20 \pm 0,39 ^b	1,46 \pm 0,61 ^b
Junio	12	1,87 \pm 0,26 ^a	2,69 \pm 0,15 ^a	0,93 \pm 0,14 ^a
Julio	10	1,87 \pm 0,19 ^a	2,94 \pm 0,19 ^{ab}	1,13 \pm 0,17 ^a
Agosto	8	1,06 \pm 0,15 ^a	2,50 \pm 0,17 ^a	0,68 \pm 0,07 ^a
ANOVA		P = 0,000031	P = 0,0000013	P = 0,000001

*Los valores con diferente superíndice presentaron diferencias significativas entre ellos

En los resultados obtenidos de los cambios en el nivel de concentración de LVT en ovario, se observaron niveles de concentración elevados dentro del periodo enero-mayo (Fig. 28), con una concentración promedio de 3.51 ng/g en el mes de febrero, sin observarse una diferencia significativa (Tabla VIII) entre los niveles promedio durante este periodo.

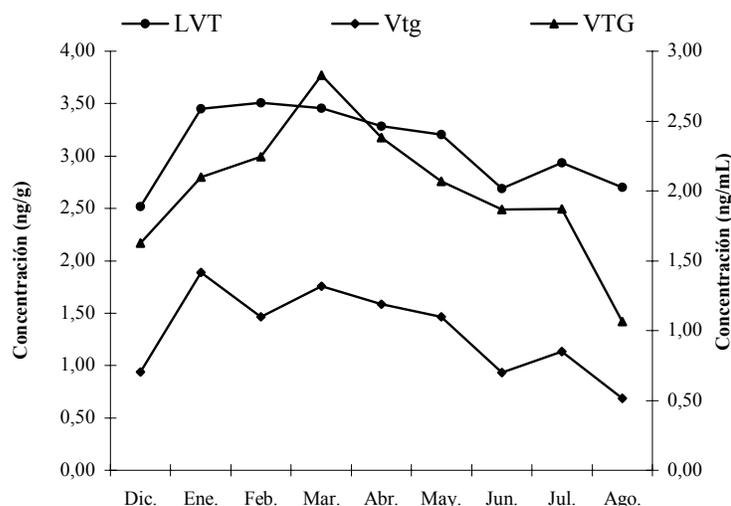


Figura 28. Variación temporal de los niveles de concentración de (▲) VTG en sangre; (●) LVT en ovario y (■) Vtg en hígado de hembras silvestres de lenguado de California.

Posteriormente, se observó un descenso en el nivel de concentración promedio a partir del mes de junio (Fig. 28). El nivel de concentración promedio observado para el mes de agosto es de 2.50 ng/g, lo que representa una diferencia significativa ($P = 0.0000013$) con respecto al nivel de concentración observado en el mes de febrero.

Los resultados en el estudio del nivel de concentración de Vtg en hígado (Fig. 28) mostraron un incremento en el nivel de concentración promedio de 1.88 ng/g para el mes de enero (Tabla VIII) con respecto al mes de diciembre. Sin embargo, se observó una disminución en el mes de febrero (1.46 ng/g) sin presentar una diferencia

significativa con respecto al nivel de concentración observado en los meses de enero, marzo, abril y mayo. El nivel de concentración mínimo de Vtg se observó para el mes de agosto, con un valor de 0.68 ng/g de tejido (Tabla VIII), lo cual representa una diferencia significativa con respecto a los valores observados para los meses de enero a mayo.

Tabla IX. Medias ajustadas ($\text{Log}_{10} \pm \text{E.S.}$) a la covariable peso corporal de vitelinas en sangre, ovario e hígado de hembras silvestres de *P. californicus* durante el periodo de muestreo.

Mes	Sangre (ng/mL)	Ovario (ng/g)	Hígado (ng/g)
Diciembre	1,78 \pm 0,27 ^a	2,57 \pm 0,20	0,99 \pm 0,21
Enero	2,11 \pm 0,19 ^b	3,46 \pm 0,14	1,89 \pm 0,15
Febrero	2,29 \pm 0,20 ^b	3,52 \pm 0,15	1,48 \pm 0,16
Marzo	2,78 \pm 0,17 ^c	3,44 \pm 0,13	1,74 \pm 0,14
Abril	2,36 \pm 0,20 ^b	3,27 \pm 0,15	1,58 \pm 0,16
Mayo	2,08 \pm 0,38 ^b	3,21 \pm 0,28	1,47 \pm 0,30
Junio	1,84 \pm 0,15 ^a	2,68 \pm 0,11	0,92 \pm 0,1
Julio	1,77 \pm 0,17 ^a	2,90 \pm 0,13	1,10 \pm 0,13
Agosto	1,05 \pm 0,19 ^a	2,50 \pm 0,14	0,68 \pm 0,15
ANCOVA	P = 0,0006	P = 0,1130	P = 0,1050

*Los valores con diferente superíndice presentaron diferencias significativas entre ellos

Las medias de los niveles de las vitelinas fueron ajustadas a la covariable PC (Tabla IX). Los resultados obtenidos del análisis ANCOVA mostraron que efectivamente hay una variación en los niveles de las vitelinas a lo largo de la temporada de muestreo. A pesar de observarse una diferencia significativa en los niveles de concentración de la VTG sanguínea (Tabla IX), dicho análisis no modificó las diferencias significativas observadas en el análisis ANOVA (Tabla VIII) para dicha variable.

7.11 Evaluación de la Variación en los Niveles de Concentración de Vitelinas vs. Estadio de Desarrollo Gonadal.

En la figura 29, se muestran los resultados obtenidos en la cuantificación de los cambios en el nivel de concentración de las vitelinas. El nivel de concentración promedio de las vitelinas en hígado, sangre y ovario en el estadio I fueron de 0.59 ng/g, 1.12 ng/mL y 1.7 ng/g, respectivamente (Tabla X)

Tabla X. Niveles de concentración promedio ($\text{Log}_{10} \pm$ error estándar) de vitelinas en hígado, sangre y ovario de hembras silvestres de *P. californicus* con relación al estadio de desarrollo gonadal.

Estadio	No. ejemplares	Hígado (ng/g)	Sangre (ng/mL)	Ovario (ng/g)
I	2	0,59 \pm 0,04 ^a	1,12 \pm 0,29 ^a	1,70 \pm 0,35 ^a
II	11	0,62 \pm 0,04 ^a	1,18 \pm 0,17 ^a	2,34 \pm 0,10 ^b
III	11	0,85 \pm 0,06 ^a	1,42 \pm 0,09 ^a	2,78 \pm 0,05 ^c
V	3	1,52 \pm 0,20 ^b	2,08 \pm 0,23 ^a	3,37 \pm 0,03 ^d
VI	8	1,83 \pm 0,12 ^b	2,67 \pm 0,10 ^b	3,53 \pm 0,03 ^d
VII	24	1,78 \pm 0,06 ^b	2,52 \pm 0,08 ^b	3,47 \pm 0,01 ^d
VIII	8	0,92 \pm 0,05 ^a	1,96 \pm 0,26 ^a	2,85 \pm 0,12 ^c
ANOVA		P = 0	P = 1,68 x 10 ⁻¹¹	P = 0

*Los valores con diferente superíndice presentaron diferencias significativas entre ellos

Para el estadio II, se observó un incremento en el nivel de concentración de LVT (2.34 ng/g), sin embargo, no presentó diferencias significativas con relación al valor observado en el estadio I. El nivel de concentración promedio de las vitelinas observado en hígado, sangre, ovario para el estadio III (0.85 ng/g, 1.42 ng/mL y 2.78 ng/g, respectivamente), presentaron diferencias significativas con relación a los valores observados para los estadios I y II (Tabla X), lo cual evidencia un aumento en el proceso vitelogénico.

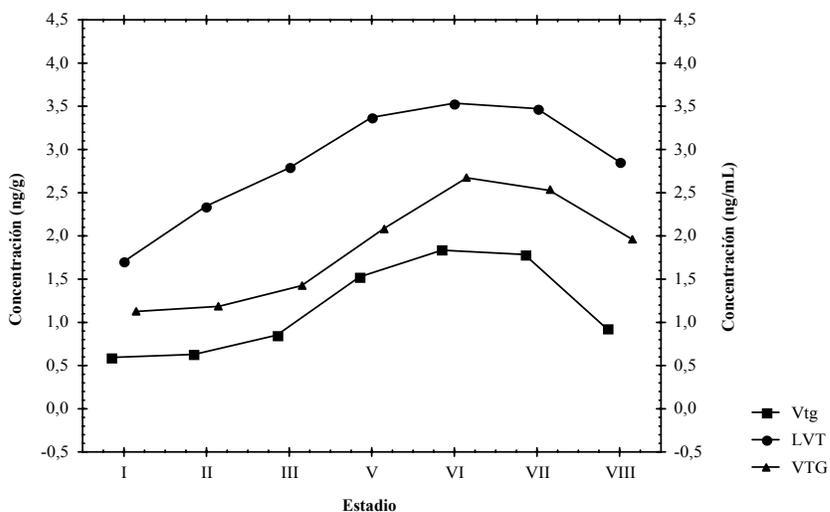


Figura 29. Niveles de vitelinas de hembras silvestres del lenguado de California, de acuerdo al estadio de desarrollo gonádico. I) Peri-nucléolo temprano; II) Peri-nucléolo tardío; III) Alvéolo cortical; V) Vitelogénesis tardía; VI) Migración de la vesícula germinal; VII) Maduración final; VIII) Folículo post-ovulatorio.

En el estadio V, el nivel de concentración de las vitelinas es aún más marcado en los tres tejidos analizados presentando valores promedio de 1.52 ng/g, 2.08 ng/mL y 3.37 ng/g (Tabla X). Los niveles máximos de LVT en ovario se observaron en hembras clasificadas en estadio VI y VII, sin presentar diferencias significativas. Estos niveles de concentración fueron de 3.53 ng/g y 3.47 ng/g, respectivamente (Tabla X). Para los mismos estadios (VI y VII), se observa que el nivel de concentración de VTG en sangre es de 2.67 ng/mL y 2.52 ng/mL y el nivel de concentración en hígado es de 1.83 ng/g y 1.78 ng/g.

Mediante el análisis de ANCOVA (Tabla XI) realizado en donde se utilizó como covariable el PC, y como factor principal (variable independiente) el estadio de desarrollo gonadal, se mostró un efecto significativo de la covariable ($P = 0.012$) para los niveles de VTG en sangre. Sin embargo, dicho efecto de la covariable no modificó

el efecto observado por el estadio de desarrollo gonadal sobre los niveles de vitelinas en los tres tejidos analizados obtenido mediante el análisis ANOVA (Tabla X).

Tabla XI. Medias ajustadas ($\text{Log}_{10} \pm \text{E.S.}$) a la covariable peso corporal (PC) de vitelinas en sangre, ovario e hígado de hembras silvestres de *P. californicus* con relación al estadio de desarrollo gonadal.

Estadio	Hígado (ng/g)	Sangre (ng/mL)	Ovario (ng/g)
I	0,59 ± 0,19	1,09 ± 0,31 ^a	1,70 ± 0,15
II	0,64 ± 0,08	1,26 ± 0,13 ^b	2,36 ± 0,06
III	0,87 ± 0,09	1,60 ± 0,15 ^c	2,81 ± 0,07
V	1,52 ± 0,15	2,02 ± 0,25 ^d	3,35 ± 0,13
VI	1,82 ± 0,09	2,55 ± 0,16 ^d	3,51 ± 0,08
VII	1,79 ± 0,05	2,60 ± 0,09 ^e	3,48 ± 0,04
VIII	0,91 ± 0,09	1,84 ± 0,16 ^d	2,83 ± 0,08
ANCOVA	P = 0,649	P = 0,012	P = 0,337

*Los valores con diferente superíndice presentaron diferencias significativas entre ellos

7.12 Evaluación de la Variación en los Niveles de Concentración de Testosterona y 17β -estradiol vs. Tiempo.

Los resultados obtenidos del estudio de las variaciones en la concentración de T y E₂ en suero mostraron dos etapas de transporte de estos esteroides. En la primera etapa (periodo diciembre-abril), se observó un incremento en el nivel de concentración promedio de T y E₂ (Fig. 30), con un nivel promedio de 0.25 ng/mL y 0.80 ng/mL; respectivamente, para el mes de marzo (Tabla XII). Por lo que se puede considerar a esta etapa como el periodo de síntesis hormonal.

Tabla XII Niveles de concentración promedio ($\text{Log}_{10} \pm$ error estándar) de esteroides sexuales testosterona y 17β -estradiol en sangre de hembras silvestres de *P. californicus* con relación a la temporada de muestreo

Mes	No. ejemplares	Testosterona (ng/mL)	17β -estradiol (ng/mL)
Diciembre	4	$-0,14 \pm 0,10^a$	$0,03 \pm 0,16^a$
Enero	8	$0,21 \pm 0,02^b$	$0,73 \pm 0,02^b$
Febrero	7	$0,21 \pm 0,01^b$	$0,77 \pm 0,02^b$
Marzo	9	$0,25 \pm 0,02^b$	$0,80 \pm 0,13^b$
Abril	7	$0,21 \pm 0,06^b$	$0,66 \pm 0,14^b$
Mayo	2	$0,06 \pm 0,15^a$	$0,47 \pm 0,14^a$
Junio	12	$0,04 \pm 0,03^a$	$0,33 \pm 0,05^a$
Julio	10	$0,008 \pm 0,05^a$	$0,42 \pm 0,07^a$
Agosto	8	$-0,003 \pm 0,02^a$	$0,16 \pm 0,07^a$
ANOVA		P = 0,000000012	P = 0,00000023

*Los valores con diferente superíndice presentaron diferencias significativas entre ellos

En la segunda etapa (periodo mayo-agosto) se observó una disminución en el nivel de concentración de los esteroides (Fig. 30), donde el nivel promedio es de -0.003 ng/mL y 0.16 ng/mL respectivamente, para el mes de agosto (Tabla XII). Considerando esta etapa como el fin del periodo de síntesis hormonal de T y E_2 .

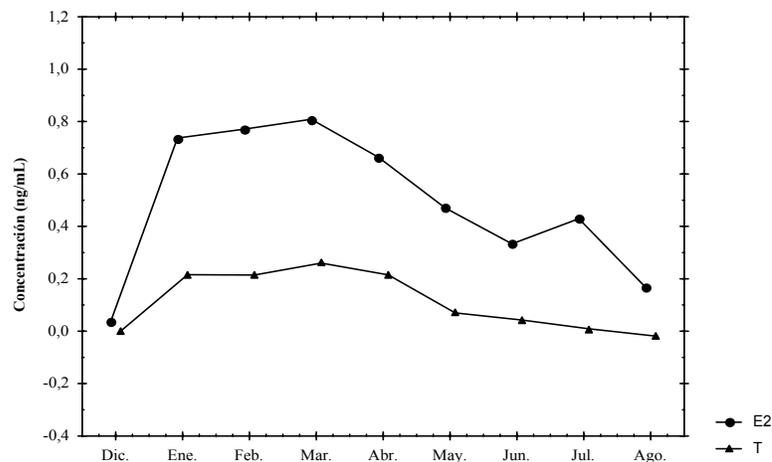


Figura 30. Cambios temporales en los niveles de (\blacktriangle) Testosterona y (\bullet) 17β -estradiol en sangre de hembras silvestres del lenguado de California.

Los resultados obtenidos mediante el análisis de ANCOVA en donde se utilizó la covariable PC no mostraron un efecto significativo de la covariable ($P = 0.856$; $P = 0.474$, respectivamente) sobre los niveles de dichas hormonas durante todo el periodo de muestreo (Tabla XIII). Por lo que se corrobora una relación entre los cambio en los niveles de T y E_2 a lo largo del periodo de muestreo.

Tabla XIII. Medias ajustadas ($\text{Log}_{10} \pm \text{E.S.}$) a la covariable peso corporal (PC) de los esteroides sexuales testosterona y 17β -estradiol en sangre de hembras silvestres de *P. californicus* durante el periodo de muestreo.

Mes	Testosterona (ng/mL)	17β -estradiol (ng/mL)
Diciembre	$0,004 \pm 0,05$	$0,04 \pm 0,10$
Enero	$0,21 \pm 0,04$	$0,73 \pm 0,07$
Febrero	$0,21 \pm 0,04$	$0,77 \pm 0,08$
Marzo	$0,25 \pm 0,03$	$0,80 \pm 0,07$
Abril	$0,21 \pm 0,04$	$0,66 \pm 0,08$
Mayo	$0,06 \pm 0,08$	$0,47 \pm 0,15$
Junio	$0,04 \pm 0,03$	$0,33 \pm 0,06$
Julio	$0,008 \pm 0,03$	$0,42 \pm 0,07$
Agosto	$-0,01 \pm 0,04$	$0,16 \pm 0,07$
ANCOVA	P = 0,856	P = 0,474

7.13 Evaluación de la Variación en los Niveles de Concentración de Testosterona y 17β -estradiol vs. Estadio de Desarrollo Gonadal.

Los resultados obtenidos en la evaluación del nivel de concentración de T y E_2 en relación con el estadio de desarrollo gonadal (Fig. 31), mostraron que los máximos niveles se observaron en hembras clasificadas en estadio VII, siendo estos niveles promedio de 0.26 ng/mL y 0.80 ng/mL, respectivamente (Tabla XIV).

Tabla XIV. Niveles de concentración promedio ($\text{Log}_{10} \pm$ error estándar) de Testosterona y 17β -estradiol en sangre de hembras silvestres de *P. californicus* con relación al estadio de desarrollo gonadal.

Estadio	No. ejemplares	Testosterona (ng/mL)	17β -estradiol (ng/mL)
I	2	$-0,19 \pm 0,15^a$	$0,04 \pm 0,17^a$
II	11	$0,01 \pm 0,03^b$	$0,24 \pm 0,04^b$
III	11	$0,01 \pm 0,01^b$	$0,26 \pm 0,02^b$
V	3	$0,11 \pm 0,009^c$	$0,67 \pm 0,03^c$
VI	8	$0,19 \pm 0,04^c$	$0,74 \pm 0,009^c$
VII	24	$0,26 \pm 0,02^c$	$0,80 \pm 0,02^c$
VIII	8	$-0,10 \pm 0,07^a$	$0,22 \pm 0,04^b$
ANOVA		P = 0	P = 0

*Los valores con diferente superíndice presentaron diferencias significativas entre ellos

Los resultados obtenidos en el nivel de concentración de T y E_2 en el estadio II mostraron un incremento en sus niveles, con un valor promedio de 0.01 ng/mL y 0.24 ng/mL, respectivamente (Tabla XIV). Se presentó una diferencia significativa ($P = 0$) con relación al valor promedio observado para el estadio I. Sin embargo, no se mostró una diferencia significativa con respecto al valor promedio observado para el estadio III. Es a partir del estadio V donde se observó un incremento en los niveles para ambos esteroides (Fig. 31) con valores de 0.11 ng/mL y 0.67 ng/mL, respectivamente (Tabla XIV). No presentaron diferencia significativa con relación a los valores promedio observado para los estadios VI y VII. El nivel de concentración promedio de T para el estadio VIII (-0.10 ng/mL) es similar al observado para el estadio I, presentando así diferencias significativas ($P = 0$) con respecto al resto de los estadios. Por otro lado, el nivel promedio de E_2 (0.22 ng/mL) presentó diferencias significativas ($P = 0$) con relación a los valores observados para los estadios I, V, VI y VIII.

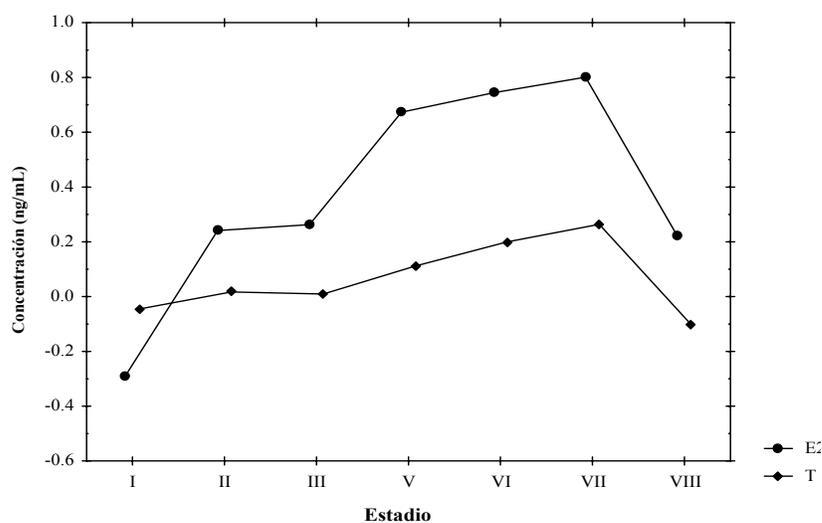


Figura 31. Cuantificación de los niveles en suero de T y E₂ en hembras silvestres de lenguado de California, de acuerdo a los diferentes estadios de desarrollo gonádico. I) Peri-nucléolo temprano; II) Peri-nucléolo tardío; III) Alvéolo cortical; V) Vitelogénesis tardía; VI) Migración de la vesícula germinal; VII) Maduración final; VIII) Folículo post-ovulatorio.

En los resultados obtenidos mediante el análisis ANCOVA (Tabla XV) se observó que las medias de los niveles de las hormonas T y E₂, ajustadas a la covariable (PC) utilizada, no mostraron un efecto significativo ($P = 0.227$; $P = 0.202$, respectivamente) de la covariable con relación al estadio de desarrollo gonadal. Con lo que se puede corroborar la existencia de una relación entre los niveles de dichos esteroides en relación con el estadio de desarrollo gonadal.

Tabla XV. Medias ajustadas ($\text{Log}_{10} \pm \text{E.S.}$) a la covariable peso corporal (PC) de los esteroides sexuales testosterona y 17 β -estradiol en sangre de hembras silvestres de *P. californicus* con relación al estadio de desarrollo gonadal.

Estadio	Testosterona (ng/mL)	17 β -estradiol (ng/mL)
I	-0,04 \pm 0,04	-0,29 \pm 0,08
II	0,02 \pm 0,02	0,25 \pm 0,03
III	0,02 \pm 0,02	0,28 \pm 0,03
V	0,11 \pm 0,03	0,66 \pm 0,06
VI	0,19 \pm 0,02	0,72 \pm 0,04
VII	0,26 \pm 0,01	0,81 \pm 0,02
VIII	-0,11 \pm 0,02	0,20 \pm 0,04 ^b
ANCOVA	P = 0,227	P = 0,202

7.14 Evaluación de los Niveles de Concentración de Vitelinas y Esteroides vs. Parámetros Ambientales.

En los resultados obtenidos, se observó que los niveles máximos de Vtg en hígado (1.57 ng/g), VTG en sangre (2.82 ng/mL) y LVT en ovario (3.45 ng/g), analizadas en el presente trabajo se encontraron a temperaturas de 16 °C (Tabla XVI). Los niveles mínimos, para las mismas vitelinas, se observaron cuando la temperatura era de 20 °C (Fig. 32), con valores de 0.88 ng/g, 1,65 ng/mL y 2.74 ng/g, respectivamente (Tabla XVI). Estos valores presentaron diferencias significativas ($P = 0.000007$; $P = 0.000044$; $P = 0.000001$, respectivamente) con relación a los valores observados para las temperaturas de 15 °C, 16 °C y 19 °C. Por otro lado, no se mostraron diferencias significativas en el nivel de concentración promedio observado para éstas temperaturas (Tabla XVI).

Tabla XVI. Niveles de concentración promedio ($\text{Log}_{10} \pm$ error estándar) de vitelinas y esteroides en hembras silvestres de *P. californicus* con relación a la temperatura del agua.

Variable	15 °C	16 °C	19 °C	20 °C	ANOVA
Vtg	1,58 ± 0,23 ^a	1,75 ± 0,09 ^a	1,46 ± 0,10 ^a	0,85 ± 0,08 ^b	P = 0,000007
VTG	2,38 ± 0,27 ^a	2,82 ± 0,06 ^a	2,04 ± 0,09 ^a	1,56 ± 0,15 ^b	P = 0,000044
LVT	3,28 ± 0,11 ^a	3,45 ± 0,02 ^a	3,26 ± 0,09 ^a	2,60 ± 0,10 ^b	P = 0,000001
E ₂	0,66 ± 0,13 ^a	0,80 ± 0,02 ^a	0,62 ± 0,04 ^a	0,22 ± 0,05 ^b	P = 0,00000003
T	0,21 ± 0,06 ^a	0,25 ± 0,02 ^a	0,13 ± 0,03 ^a	-0,004 ± 0,02 ^b	P = 0,000041

*Los valores con diferente superíndice presentaron diferencias significativas entre ellos

Los niveles de concentración de las hormonas esteroides T y E₂ (Fig. 33), presentaron un patrón similar al observado para los niveles de vitelinas. Es a la temperatura de 16 °C cuando se observaron los niveles máximos para T (0.25 ng/mL) y E₂ (0.80 ng/mL).

Los niveles de concentración mínimos reportados para T y E₂, en el presente trabajo, fueron de -0.004 ng/mL y 0.22 ng/mL cuando la temperatura del agua se encontró a 20 °C (Tabla XVI).

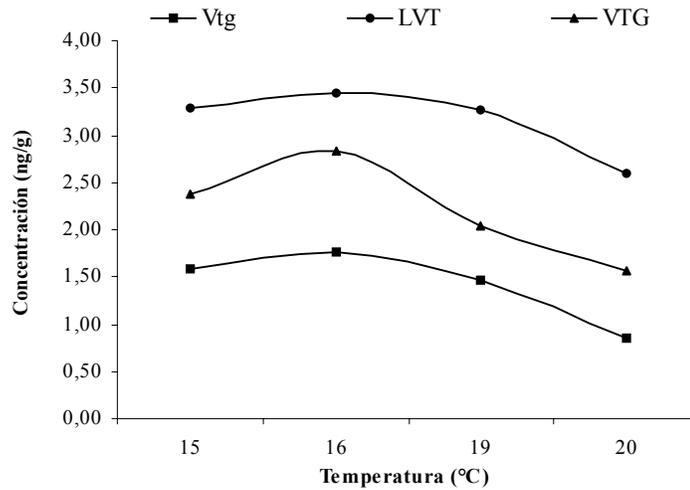


Figura 32. Variación del nivel de concentración de (●) LVT en ovario; (▲) VTG en sangre y (■) Vtg en hígado de hembras silvestres de lenguado de California con relación a la temperatura del agua.

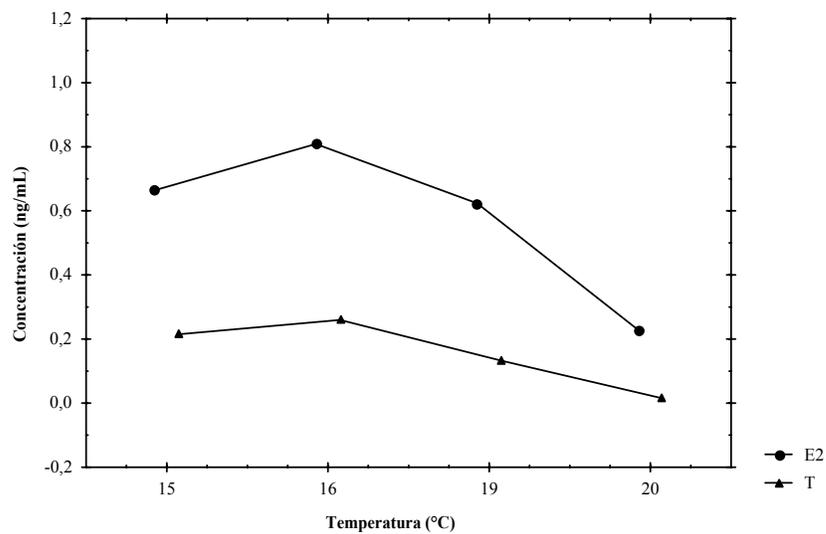


Figura 33. Cambios en los niveles de (●) 17β-estradiol y (▲) Testosterona en sangre de hembras silvestres del lenguado de California con relación a la temperatura del agua.

Los resultados obtenidos mediante el análisis de ANCOVA (Tabla XVII) para las vitelinas (Vtg, VTG, LVT) y esteroides sexuales (T, E₂) no mostraron diferencias significativas (P = 0.324; P = 0.291; P = 0.693; P = 0.692, respectivamente) con relación a los cambios de temperatura durante el periodo de muestreo.

Tabla XVII. Medias ajustadas ($\text{Log}_{10} \pm \text{E.S.}$) a la covariable peso corporal (PC) de vitelinas y esteroides sexuales de hembras silvestres de *P. californicus* con relación a la temperatura del agua.

Variable	15 °C	16 °C	19 °C	20 °C	ANCOVA
Vtg	1,58 ± 0,17	1,75 ± 0,15	1,46 ± 0,09	0,86 ± 0,09	P = 0,324
VTG	2,37 ± 0,22 ^{ac}	2,80 ± 0,19 ^c	2,04 ± 0,11 ^a	1,58 ± 0,11 ^d	P = 0,003
LVT	3,28 ± 0,16	3,45 ± 0,14	3,26 ± 0,08	2,61 ± 0,08	P = 0,291
E ₂	0,66 ± 0,09	0,81 ± 0,08	0,62 ± 0,04	0,23 ± 0,04	P = 0,693
T	0,22 ± 0,04	0,26 ± 0,04	0,13 ± 0,02	0,01 ± 0,02	P = 0,692

*Los valores con diferente superíndice presentaron diferencias significativas entre ellos.

Excepto para los niveles de VTG sanguínea para los cuales se observó un efecto significativo de la covariable (P = 0.003), pero sin modificar los resultados obtenidos en el análisis ANOVA (Tabla XVI). Se observó que durante la temperatura de 16 °C la VTG alcanza sus máximos niveles. Un patrón similar fue observado en el análisis de ANOVA (Tabla XVI). Por lo tanto, se puede asumir que existe un efecto en la variación de los niveles de concentración de las vitelinas y los esteroides sexuales causado por los cambios en la temperatura durante el periodo de muestreo.

En el presente trabajo, se analizaron los cambios en el nivel de concentración de LVT bajo la influencia del fotoperiodo durante la temporada de muestreo (Fig. 34). Los resultados demostraron que el nivel máximo de LVT (3.50 ng/g) es bajo un fotoperiodo

de 11 h-L. Sin presentar diferencias significativas con relación a un fotoperiodo de 10 h-L y 12 h-L. Es bajo un fotoperiodo de 13 h-L cuando se observó el nivel mínimo (2.83 ng/g), presentando diferencias significativas ($P = 0.024$) con relación a los otros fotoperiodos (Tabla XVIII). Este mismo comportamiento se observó para T y E₂ (Fig. 34), presentando diferencias significativas de $P = 0.0123$ y $P = 0.0283$, respectivamente (Tabla XVIII).

Tabla XVIII. Niveles de concentración promedio ($\text{Log}_{10} \pm$ error estándar) de vitelinas y esteroides en hembras silvestres de *P. californicus* con relación al fotoperiodo.

Variable	10:00	11:00	12:00	13:00	ANOVA
Vtg	$1,57 \pm 0,07^a$	$1,46 \pm 0,15^a$	$1,35 \pm 0,12^a$	$1,05 \pm 0,11^b$	$P = 0,048$
VTG	$1,94 \pm 0,10$	$2,45 \pm 0,14$	$2,11 \pm 0,18$	$1,88 \pm 0,15$	$P = 0,593$
LVT	$3,14 \pm 0,14^a$	$3,50 \pm 0,04^a$	$3,08 \pm 0,10^a$	$2,83 \pm 0,11^b$	$P = 0,0246$
E ₂	$0,50 \pm 0,11^a$	$0,77 \pm 0,02^a$	$0,55 \pm 0,07^a$	$0,38 \pm 0,04^b$	$P = 0,0283$
T	$0,09 \pm 0,06^a$	$0,21 \pm 0,014^b$	$0,15 \pm 0,03^b$	$0,03 \pm 0,02^a$	$P = 0,0123$

*Los valores con diferente superíndice presentaron diferencias significativas entre ellos

El nivel de concentración promedio de VTG en sangre presentó un patrón un tanto similar al descrito para LVT, T y E₂, sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($P = 0.593$) en los valores promedio a lo largo del estudio. Los niveles de concentración de Vtg en hígado presentan un patrón diferente al observado para las vitelinas y esteroides analizados anteriormente, ya que se observa que el nivel máximo (1.57 ng/g, Tabla XVIII) se presenta al inicio de la temporada de estudio. Posteriormente, se observó una disminución gradual en el nivel de concentración conforme se va incrementando el fotoperiodo (Fig. 34), con un valor mínimo de 1.05 ng/mL (Tabla XVIII) cuando éste alcanza las 13:00 h-L.

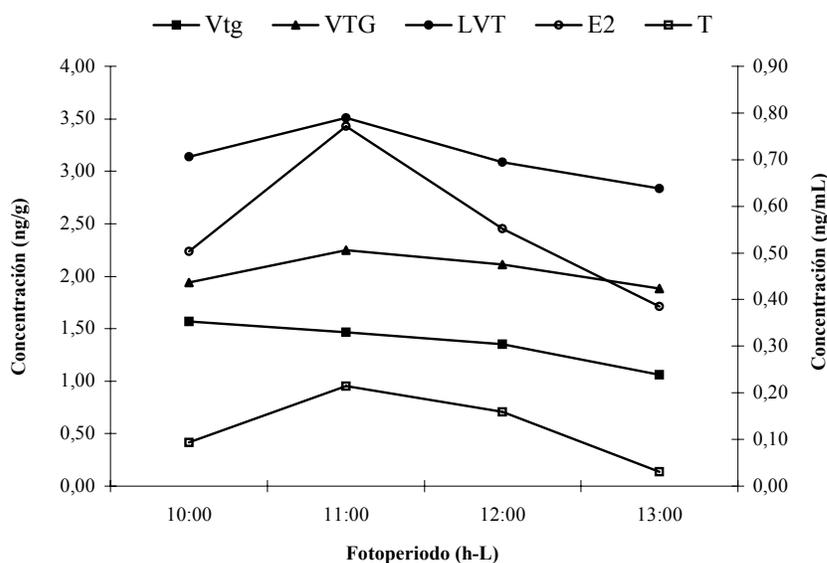


Figura 34. Variación de los niveles de concentración de (▲) VTG en sangre; (●) LVT en ovario; (■) Vtg en hígado (○) E₂ y (□) T en sangre de hembras silvestres de langostino de California con relación al fotoperiodo.

Los resultados del análisis de ANCOVA (Tabla XIX), en donde también se utilizó el PC como covariable, mostraron solo un efecto significativo de esta sobre los niveles de VTG sanguínea ($P = 0.008$), aspecto contrario a lo observado en el análisis ANOVA (Tabla XIX).

Tabla XIX. Medias ajustadas ($\text{Log}_{10} \pm \text{E.S.}$) a la covariable peso corporal (PC) de vitelinas y esteroides sexuales de hembras silvestres de *P. californicus* con relación al fotoperiodo.

Variable	10:00	11:00	12:00	13:00	ANCOVA
Vtg	$1,60 \pm 0,15$	$1,48 \pm 0,20$	$1,34 \pm 0,11$	$1,03 \pm 0,11$	$P = 0,095$
VTG	$2,00 \pm 0,20^a$	$2,28 \pm 0,26^b$	$2,08 \pm 0,14^{ab}$	$1,82 \pm 0,14^c$	$P = 0,008$
LVT	$3,16 \pm 0,04$	$3,52 \pm 0,19$	$3,08 \pm 0,10$	$2,81 \pm 0,10$	$P = 0,090$
E ₂	$0,51 \pm 0,08$	$0,78 \pm 0,11$	$0,55 \pm 0,06$	$0,38 \pm 0,06$	$P = 0,295$
T	$0,15 \pm 0,04$	$0,22 \pm 0,05$	$0,15 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,02$	$P = 0,657$

*Los valores con diferente superíndice presentaron diferencias significativas entre ellos

Señalando así que los cambios en los niveles de concentración de la VTG en sangre pueden estar en función al peso corporal y no a los cambios en el fotoperiodo observados durante la temporada de muestreo.

Finalmente, se analizó el posible efecto de la salinidad del agua sobre la variación en el nivel de concentración de las vitelinas y esteroides (Fig. 35). Se observó que bajo una salinidad del agua de 37 ppm el nivel de concentración promedio para Vtg en hígado (1.71 ng/g), LVT (3.35 ng/g), E₂ (0.67 ng/mL) y T (0.19 ng/mL), presentaron diferencias significativas con relación a los valores promedios obtenidos en muestras bajo una salinidad del agua de 35 ppm (Tabla XX). Por otro lado, para éstas mismas variables, el nivel promedio observados bajo la influencia de una salinidad del agua de 36 ppm (1.49 ng/g; 3.28 ng/g; 0.64 ng/mL y 0.16ng/mL, respectivamente) no presentaron diferencias significativas con relación a los valores promedios observados bajo una salinidad del agua de 37 ppm.

Tabla XX. Niveles de concentración promedio ($\text{Log}_{10} \pm$ error estándar) de vitelinas y esteroides en hembras silvestres de *P. californicus* con relación a la salinidad del agua.

Variable	35 ppm	36 ppm	37 ppm	ANOVA
Vtg	0,93 \pm 0,08 ^a	1,49 \pm 0,09 ^b	1,71 \pm 0,12 ^b	P = 0,0000008
VTG	1,65 \pm 0,14 ^a	2,38 \pm 0,11 ^b	2,21 \pm 0,14 ^b	P = 0,000720
LVT	2,72 \pm 0,10 ^a	3,28 \pm 0,09 ^b	3,35 \pm 0,06 ^b	P = 0,000012
E ₂	0,32 \pm 0,04 ^a	0,64 \pm 0,07 ^b	0,67 \pm 0,06 ^b	P = 0,000028
T	0,02 \pm 0,02	0,16 \pm 0,04	0,19 \pm 0,03	P = 0,000185

*Los valores con diferente superíndice presentaron diferencias significativas entre ellos

Por otro lado, el nivel de concentración máximo para VTG en sangre (2.38 ng/mL) se observó bajo una salinidad del agua de 36 ppm (Fig. 35), presentando posteriormente una disminución (2.21 ng/mL) cuando la salinidad del agua se encontraba a 37 ppm. Sin embargo, dichos valores no presentaron diferencias significativas entre ambos (Tabla XX). Dicha diferencia significativa ($P = 0.00072$) se presentó con relación al nivel promedio observado (1.65 ng/mL) cuando la salinidad del agua era de 35 ppm.

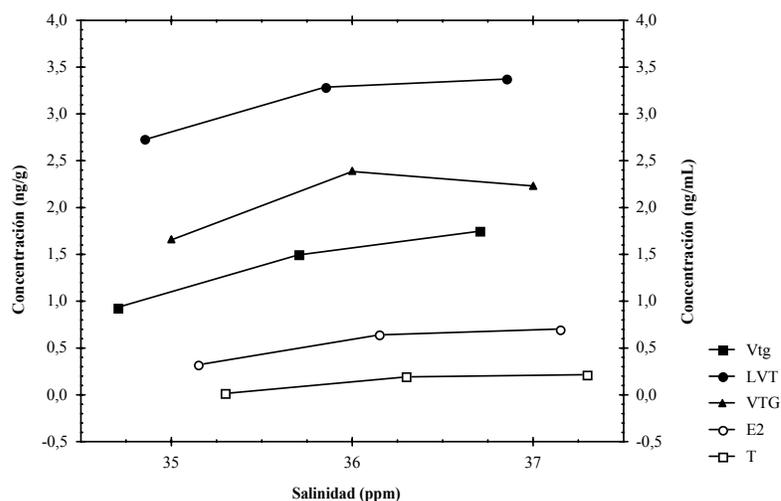


Figura 35. Variación de los niveles de concentración de (▲) VTG en sangre; (●) LVT en ovario; (■) Vtg en hígado (○) E₂ y (□) T en sangre de hembras silvestres de lenguado de California con relación a la salinidad.

En los resultados obtenidos mediante el análisis de ANCOVA se observó un efecto significativo de la covariable PC sobre los niveles de Vtg, VTG y LVT ($P = 0.036$; $P = 0.0002$; $P = 0.0402$, respectivamente) (Tabla XXI). Dichas diferencias no modificaron los resultados obtenidos en el análisis ANOVA (Tabla XX) realizado para las mismas variables con relación a los cambios en la salinidad del agua. Estos resultados pueden ser interpretados como un cambio en los niveles de concentración de las vitelinas en función a una combinación de ambas variables.

Tabla XXI. Medias ajustadas ($\text{Log}_{10} \pm$ error estándar) a la covariable peso corporal (PC) de vitelinas y esteroides en hembras silvestres de *P. californicus* con relación a la salinidad del agua.

Variable	35 ppm	36 ppm	37 ppm	ANCOVA
Vtg	$0,91 \pm 0,08^a$	$1,51 \pm 0,10^b$	$1,72 \pm 0,11^b$	$P = 0,0367$
VTG	$1,61 \pm 0,11^a$	$2,42 \pm 0,13^b$	$2,22 \pm 0,14^b$	$P = 0,0002$
LVT	$2,70 \pm 0,08^a$	$3,30 \pm 0,10^b$	$3,36 \pm 0,11^b$	$P = 0,0402$
E_2	$0,31 \pm 0,05$	$0,65 \pm 0,06$	$0,68 \pm 0,06$	$P = 0,1602$
T	$0,01 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,03$	$P = 0,4779$

*Los valores con diferente superíndice presentaron diferencias significativas entre ellos

Por otro lado, no se observó un efecto significativo de la covariable PC sobre los niveles de T y E_2 ($P = 0.47$; $P = 0.16$, respectivamente) en el análisis de ANCOVA (Tabla XXI). Señalando así que los cambios en la salinidad del agua durante la temporada de captura jugaron un papel preponderante en el proceso de esteroidogénesis superior al tamaño del animal.

8. DISCUSIÓN.

En el presente trabajo se describe por primera vez los diferentes estadios de desarrollo gonadal para el lenguado de California. Las observaciones están hechas sobre gónadas de hembras silvestres capturadas en la Zona de Bahía Magdalena, B.C.S., y revela aspectos sobre el ciclo reproductivo en el medio natural. La interpretación de los resultados es acorde al intervalo de tallas (36-56 cm) de los organismos capturados. La morfología de los ocho estadios ováricos y su patrón de desarrollo gonadal descritos aquí presentan similitudes con los descritos para algunos peces planos (Merson et al., 2000; Norberg et al., 1991) y teleósteos en general (Rosenblum et al., 1983; Berlinsky y Specker, 1991; Rinchar et al., 1993; Giulianini et al., 1994; Tayler y Sumter, 1996). El examen histológico de las gónadas de *P. californicus* revela una organización funcional del ovario de tipo asincrónico, según la descripción hecha por Wallace y Selman, (1981) y De Vlaming (1983), determinado por la presencia de ovocitos en los diferentes estadios de desarrollo, sin una población claramente dominante.

En la primera fase: el crecimiento primario del ovocito (inmaduro) en el lenguado de California (*peri-núcleo temprano*, *peri-núcleo tardío*, independientes de gonadotropinas) se desarrolla de manera análoga a lo descrito para otros lenguados *P. dentatus* (Merson et al., 2000), *Limanda limanda* (Htun-Han, 1978) y teleósteos en general, *Paraperis colias* (Pankhurst y Cornoy, 1987), *Cynoscion nebulosus* (Brown-Peterson et al., 1988), *Pagrus major* (Matsuyama et al., 1988), *Gobio gobio* (Rinchar et al., 1993), *Zosterisessor ophiocephalus* (Giulianini et al., 1994). El incremento observado en el tamaño del ovocito de *P. californicus* (Fig. 20 A), en el presente estudio, puede explicarse como una consecuencia de la formación de organelos

citoplasmáticos conocidos como *cuerpos de Balbiani* (mitocondrias, cuerpos multivesiculares, retículo endoplasmático, aparato de Golgi) y material basofílico (ribonucleoproteínas). Al mismo tiempo, la zona radiata se ensancha desarrollando una compleja serie de microvellosidades, lo que permite así la comunicación entre la capa granulosa y el ovocito (Tyler y Sumpter, 1996). Esto resulta en un incremento del diámetro nuclear (vesícula germinal) y la aparición de nucleolos y gotas lipídicas en el estadio II (Fig. 20 B). Esta proliferación de nucleolos es indicativa de una amplificación de genes del ribosoma (Wallace y Selman, 1981; De Vlaming, 1983; Tyler y Sumpter, 1996). La primera fase de crecimiento es independiente a la acción de las GtH's, ya que se caracteriza por presentar una intensa actividad de síntesis de ARN (Tyler y Sumpter, 1996) y poco se sabe acerca de un posible papel de las hormonas esteroideas dentro de esta fase (De Vlaming, 1983). A pesar de observarse dicho incremento del ovocito en el estadio II, se considera al mismo como inmaduro debido a que no presenta diferencia significativa en el nivel de concentración de vitelinas comparados con los ovocitos en estadio I (Merson et al., 2000).

En peces teleósteos, la fase dos o crecimiento secundario del ovocito (*alvéolo cortical*), el incremento en el diámetro del ovocito está dada por un proceso de vitelogénesis endógena (dependiente de gonadotropinas) y ocurre con la producción de alvéolos corticales que contienen material AA-positivo (Khoo, 1979; Nagahama, 1983; Wallace y Selman, 1981; Tyler y Sumpter, 1996). En el presente estudio con *P. californicus* esta fase se distinguió por la presencia de alvéolos corticales. También aparecen simultáneamente gotas lipídicas (Fig. 20 C) que pudieran estar asociadas con el componente lipídico de la VTG (Tyler y Sumpter, 1996) y está caracterizado por la

producción endógena de poliglicoproteínas sintetizadas, al parecer, por el retículo endoplásmico y/o aparato de Golgi (Wallace y Selman, 1981). Este mismo patrón se ha observado en *P. dentatus* (Merson et al., 2000), *L. limanda* (Htun-Han, 1978), *C. nebulosus* (Brown-Peterson et al., 1988), *Pagrus major* (Matsuyama et al., 1988), *Parophrys vetulus* (Jonhson et al., 1991), *Zosterisessor ophiocephalus* (Giulianini et al., 1994) y *Acipenser ruthenus* (Mojazi et al., 1996),.

La vitelogénesis exógena (*temprana y tardía*, fase tres), presentó en el ovario de *P. californicus* un patrón de crecimiento del ovocito similar al descrito para *P. dentatus* (Merson et al., 2000), *Pagrus major* (Matsuyama et al., 1988), *Morone saxatilis* (Berlinsky y Specker, 1991), *Gobio gobio* (Rinhard et al., 1993), *Acipenser ruthenus* (Mojazi et al., 1996) ente otros. El considerable incremento en el tamaño de los ovocitos observados dentro de estos estadios coincide con la presencia de glóbulos de vitelo así como de niveles elevados de vitelinas (Fig. 29) y esteroides sexuales (Fig. 31). Dicha presencia es debido a la captación de proteínas extracelulares (VTG) provenientes del hígado vía micropinocitosis (Ng e Idler, 1983) lo que puede explicar la variación (incremento) en el tamaño medio de los ovocitos (Tabla V) observada en las hembras de *P. californicus*. Este mecanismo es análogo al observado en anfibios (Ng e Idler, 1983) y ocurre en la mayoría de los teleósteos marinos que desovan huevos pelágicos (Norberg et al., 1991; Tyler y Sumpter, 1996; Matsubara y Koya, 1997; Matsubara et al., 1999).

Los ovocitos considerados como maduros (*migración de la vesícula germinal, maduración final*, fase cuatro) en este estudio para *P. californicus* se caracterizaron en

primera instancia por un movimiento de la VG hacia el polo animal (Fig. 22 B, C, D) lo que coincide con los niveles máximos observados de las vitelinas (Tabla X) así como de niveles elevados de T y E₂ (Tabla XIV). Una vez que ha migrado la VG ocurren cambios bioquímicos y físicos como el rompimiento de la membrana nuclear y la fusión de los glóbulos de vitelo, suceso utilizado comúnmente como indicador de maduración del ovocito (De Vlaming, 1983). La *maduración final* de los ovocitos para *P. californicus* se caracterizó por presentar un incremento en el tamaño del ovocito y una apariencia translúcida debido a una marcada hidratación (Fig. 23 A). Este estadio coincide con los niveles máximos observados de los esteroides sexuales (Fig. 31) y un decremento en los niveles de las vitelinas (Fig. 29). El decremento en los niveles de VTG puede ser atribuido a un cambio en la habilidad de captación del ovocito (Ng e Idler, 1983). El mecanismo de hidratación junto con los posibles flujos iónicos durante la maduración final, al parecer, es causado por un ajuste osmótico, debido a un incremento en aminoácidos libres que permiten el flujo de agua dentro del ovocito (Wallace y Selman, 1981; Greely et al., 1986; Carnevali et al., 1992) y una segunda actividad proteolítica de las proteínas del vitelo (Matsubara y Koya, 1997; Matsubara et al., 1999). Proceso que al parecer es básico en peces marinos con desarrollo asincrónico y huevos pelágicos (De Vlaming, 1983; Greely et al., 1986; Tyler y Sumpter, 1996). Este mismo patrón de desarrollo gonadal se ha observado en *P. dentatus* (Merson et al., 2000), *H. hippoglossus* (Norberg, et al., 1991), *Verasper moseri* (Matsubara y Koya, 1997), *C. nebulosus* (Brown-Peterson et al., 1988) y otros teleósteos marinos (Greely et al., 1986; Carnevali et al., 1992; Kjesbu et al., 1992).

Cuando se realizan estudios sobre la actividad gonádica en peces silvestres, animales de diferente tamaño son capturados y generalmente se asume que el peso gonádico depende del tamaño del animal y del estadio de desarrollo gonadal. Partiendo del supuesto de que el peso ovárico está relacionado con la fecundidad, la relación entre el peso ovárico con la longitud total o el peso corporal puede variar con la temporada reproductiva (De Vlaming et al., 1982). En el presente trabajo, se evaluó la posible relación del peso corporal con los niveles de vitelinas y esteroides sexuales en hembras del lenguado de California (intervalo 0.5 a 1.8 Kg.). Los resultados muestran que las hembras con pesos inferiores a 1Kg. presentaron niveles inferiores a las hembras con pesos corporales superiores a 1Kg. Esto se pudo corroborar con un análisis de correlación entre la VTG circundante en sangre y el peso del animal (Tabla VII). Por lo que puede señalarse que el tamaño del animal está relacionado con la actividad de síntesis de vitelinas y esteroides o mejor dicho con la capacidad reproductiva (Person-Le Ruyet, 1990). Esto parece indicar que el número de ovocitos que entrarán en vitelogénesis, en peces pequeños, será menor al comparado con los peces grandes. Así pues, peces grandes pueden producir proporcionalmente huevos más grandes que los peces pequeños. Discutiblemente, podría asumirse que los huevos más grandes poseen mayor reserva de vitelo y por consiguiente podrían ofrecerse una mayor ventaja al desarrollo del embrión (Pottinger y Carrick, 2000). O visto desde otro punto de vista, el peso del pez tiene un gran efecto sobre el peso ovárico cuando los peces tienen ovarios en maduración que cuando los ovarios están inactivos (De Vlaming et al., 1982).

Los niveles de VTG en sangre de teleósteos hembras están asociados con un marcado incremento de la actividad reproductiva y pueden servir como indicadores del grado de

desarrollo gonadal, así como para refinar técnicas de inducción hormonal en cautiverio (Fostier y Jalabert, 1986; Pavlidis et al., 2000; Barcellos et al., 2001; Zohar y Mylonas, 2001). Durante la temporada de captura, el nivel de concentración de la LVT en ovario fue alto y constante de enero hasta finales de mayo (Tabla VIII) y concuerdan con la talla máxima de ovocito observada para el mismo periodo (Fig. 26). Se observó una concentración elevada de Vtg hepática durante el periodo enero-mayo (Tabla VIII). La gran concentración de Vtg hepática observada durante este periodo puede ser explicada por la síntesis de Vtg. La cual fue acumulada en el ovocito durante este periodo y estuvo caracterizado por una fuerte actividad vitelogénica. Los niveles de VTG en sangre muestran, al parecer, incrementos graduales durante el periodo diciembre-abril, presentando un pico máximo en el mes de marzo (Fig. 28). Estos incrementos graduales pueden estar dados por la presencia de ovocitos en vitelogénesis, mientras que otra porción está en maduración final. El pico de VTG observado en el mes de marzo puede ser el resultado de un decremento en número de ovocitos vitelogénicos, y por lo tanto una reducción en la habilidad del ovario en captar VTG, durante el proceso de la temporada reproductiva, teniendo como consecuencia desoves parciales (Methven et al., 1992). Sin embargo, es necesario tomar en cuenta que el sistema de retroalimentación de Vtg hepática y vitelina acumulada en el ovario se efectúa por medio de la sangre. Los niveles de VTG en sangre no puede ser considerados como una concentración estable o continua (lugar de almacenamiento) ya que sólo es un medio de transporte y sus niveles no reflejan estrictamente proceso de síntesis, ya que los niveles en sangre son afectados tanto por el proceso de captación ovárica como por el de síntesis hepática (Larsson et al., 2002). Una rápida captación de VTG sanguínea por parte de los ovocitos se ha observado que en peces desovadores parciales, los ovocitos pasan por el

estadio de vitelogénesis en periodos muy cortos, de 5-7 semanas, como se ha observado en *H. hippoglossus* (Methven *et al.*, 1992), *Morone saxatilis* (Blythe *et al.*, 1994) y *Gasterosteus aculeatus* (Wallace y Selman, 1979). En este último, los ovocitos pasan a través del estadio de vitelogénesis en tan solo cinco días. Esto puede estar dado en función al tamaño mínimo necesario del ovocito antes de entrar al estadio de vitelogénesis y al tamaño crítico para dar fin al periodo de síntesis de VTG (Tyler y Sumpter, 1996). Por lo tanto las fluctuaciones de las vitelinas observadas en el presente trabajo pueden estar relacionadas con el ciclo reproductivo y más estrechamente con el desarrollo gonadal (Mathven *et al.*, 1992).

Por otro lado, los resultados demuestran, por primera vez en el lenguado de California, detalles de los cambios en los niveles de concentración de las vitelinas (Vtg, VTG y LVT) de acuerdo al estadio de desarrollo gonadal. Los niveles presentaron variación entre los individuos inmaduros, vitelogénicos y post-vitelogénicos ($P < 0.05$). Las hembras en primera fase de desarrollo gonadal con ovocitos menores de 140 μm (Tabla V) presentan niveles basales de vitelinas (Tabla X), sustancialmente se elevan los niveles de estas (Fig. 29), bajo un incremento en el fotoperiodo (Fig. 34) y un descenso en la temperatura (Tabla XV) en hembras que presentan ovocitos que muestran histológicamente evidencia de captación y procesamiento de VTG dentro del ovocito en forma de gránulos de vitelo. Posteriormente se observa una disminución en los niveles de las vitelinas en hembras en estadio post-ovulatorio (Fig. 29), bajo una disminución del fotoperiodo (13:00-12:00) y un incremento de temperatura (15-20 °C). Sin embargo, aún se observa niveles altos de LVT y VTG (Tabla X) en hembras en estadio VIII. La presencia de VTG en sangre que no es captada por el ovocito puede ser

reabsorbida y servir como fuente de energía para las hembras después del desove. Así mismo, la presencia de estas vitelinas, posterior al desove, puede ser debido al proceso de reabsorción del vitelo durante la atresia folicular, como se ha observado en *Salmo trutta* (Norberg et al., 1989). Por otro lado, este es un aspecto característico del tipo de desarrollo gonadal asincrónico y del comportamiento de peces desovadores múltiples ya que el ovario puede contener ovocitos previtelogénicos y vitelogénicos después de la ovulación (Pavlidis et al., 2000). Este mismo comportamiento, en el seguimiento de la evolución de las vitelinas durante el desarrollo gonadal, con niveles de concentración diferentes, se ha reportado en *Pseudopleuronectes americanus* (Nagler e Idler, 1990), *H. hippoglossus* (Methven et al., 1992), *Pleuronectes vetulus* (Lomax et al., 1998), *Salmo gairdneri* (Nagler et al., 1987); *Cynoscion nebulosus* (Copeland y Thomas, 1988), *Parophrys vetulus* (Jonhson et al., 1991), *Morone saxatilis* (Tao et al., 1993), , *Mycteroperca microlepis* (Heppell y Sullivan, 1999). Esta diferencia entre las especies con respecto al nivel de concentración de vitelinas y sus perfiles temporales son probablemente una consecuencia de las diferentes estrategias reproductivas, duración del proceso de vitelogenénesis y tamaño del ovocito durante el desarrollo gonadal (Mañanos et al., 1994) o por la diferencia en los métodos de estudio (Wang et al., 2001).

Con el fin de evidenciar el posible efecto de hormonas esteroides, Testosterona y 17β -estradiol, se evaluaron los cambios en el nivel de concentración de los esteroides mediante un análisis RIA. Los resultados obtenidos muestran dos etapas de transporte de los esteroides. En este estudio, la primera etapa muestra un incremento en el nivel de concentración de las hormonas T y E_2 durante el periodo diciembre-abril (Fig. 30), lo cual se puede asumir como el tiempo de mayor actividad esteroideogénica. Proceso

consistente con la hipótesis de que E_2 estimula la síntesis de Vtg hepática, secretada al torrente sanguíneo y almacenada en el ovario (Wallece y Selman, 1981; Ng e Idler, 1983). Los niveles altos observados de T y E_2 durante el periodo enero-abril (Tabla XII) concuerdan con los observados para las vitelinas (Tabla XIV), indicando así que la vitelogénesis y niveles altos de E_2 están correlacionados (Mojazir et al., 1996). En la segunda etapa, se observa una disminución en el nivel de concentración de los esteroides durante el periodo mayo-agosto (Fig. 30). Este patrón de cambio en el nivel de concentración de los esteroides durante el periodo de maduración es, en general, similar al observado en otras especies de lenguados *Pleuronectes platessa* (Wingfield y Crim, 1977), *Hippoglossus stenolepis* (Liu et al., 1991) y otros teleósteos (Fostier et al., 1983).

Por otro lado, en el presente trabajo se describen estos cambios en el nivel de concentración de los esteroides T y E_2 con relación al desarrollo gonadal en hembras silvestres del lenguado de California. Las hembras en estadio pre-vitelogénico y alvéolo cortical presentan niveles de concentración basales de T y E_2 (Tabla XIV). Estos resultados concuerdan con los encontrados en otros teleósteos (Wingfield y Grimm, 1977; Pankhurst y Carnoy, 1987; Berlinsky y Specker, 1991). Las hembras con un nivel de concentración significativamente altos se observan a partir del estadio V (Fig. 31). Estos resultados contrastan con los reportados por Merson et al. (2000) para *P. dentatus*, donde los niveles de concentración de E_2 en sangre fueron significativamente altos a partir del estadio *alveolo cortical*, indicando la activación del eje HPG. En otras especies la presencia de E_2 y su precursor T, no es detectada en sangre hasta el estadio de vitelogénesis incluyendo *P. ventulus* (Jonhson et al., 1991), *P.*

americanus (Harmin et al., 1995) y *M. Saxatilis* (Tao et al., 1993) donde el nivel de concertación de E₂ incrementa significativamente cuando los glóbulos de vitelo son histológicamente observables, como es el caso en este estudio. Los niveles altos de T y E₂ observados previo al desove (estadio VII, Fig. 31) puede deberse a que en la mayoría de los peces desovadores parciales los niveles de estas hormonas son altos durante la temporada de desove (Matsuyama et al., 1990; Wang et al., 2001), lo que puede explicar el mantenimiento de la vitelogénesis y la producción de estos esteroides por la presencia de folículos vitelogénicos (Kagawa et al., 1982, Prat et al., 1990). Otro aspecto a considerar, es que un nivel alto en E₂ preovulatorio pueda permitir excretar cantidades suficientes de productos estrogénicos vía orina que actúen como un tipo de feromona que estimule y atraiga machos hacia las hembras en etapa de ovulación (Comish, 1998) sincronizando así los desoves (Pankhurst y Cornoy, 1988). El papel funcional de T en las hembras no está muy claramente establecido. Quizás los niveles de concentración elevados de T simplemente reflejan, en general, un incremento en la actividad secretora de esteroides en la gónada, sirviendo como principal precursor en la síntesis de E₂. Alternativamente, T puede regular algunos aspectos en el desarrollo gonadal, tales como estimular la formación de los glóbulos de vitelo, actuar en el incremento de la síntesis de GTH sobre P (Malison et al., 1994), o incluso afectar la maduración final ya que estimula el rompimiento de la VG, como se observó, *in vitro*, en *Oncorhynchus rhodurus* (Young et al., 1983). Sin embargo, los niveles de concentración máximo de los esteroides aquí reportados (Tabla XIV) son aproximadamente de una a dos ordenes de magnitud diferentes comparados con los reportados en otras especies (Wingfield y Grimm, 1977; Campbell et al., 1976; Berlinsky y Specker, 1991). Tales diferencias pueden ser debidas al tipo de análisis utilizado, condiciones nutricionales de la hembra,

si se trata de una especie nativa o cautiva, ya que hay evidencias que sugieren que el nivel de concentración de esteroides sexuales en sangre son bajos en especies en cautiverio comparado con las especies nativas (Liu et al., 1991). Por otro lado, Safford y Thomas (1987) demostraron que los diferentes métodos de captura pueden influir en los niveles de concentración de los esteroides en diferente grado.

La mayoría de los hábitats están sujetos a cambios ambientales en tiempos más o menos periódicos, siendo el resultado de la acción superpuesta de tres tipos de ciclos astronómicos: diurno, lunar, anual y de las características geográficas de la región (Munro, 1990; Redding y Patiño, 1993). De ahí el desarrollo y sincronización de estrategias reproductivas con dichos cambios ambientales de tal manera que, aumente al máximo el potencial de fecundidad y por lo tanto maximice la fertilización y supervivencia de la progenie cuando las condiciones sean tan óptimas como puedan predecirse (Munro, 1990). Por ello, en el presente trabajo, los cambios en los parámetros ambientales, fotoperiodo, temperatura y salinidad se correlacionaron con los cambios en los niveles de concentración de vitelinas y esteroides sexuales, con la finalidad de establecer factores que puedan servir como predictores o sincronizadores del ciclo reproductivo de *P. californicus*. Los resultados obtenidos, en el presente trabajo, muestran que un descenso en la temperatura (20 °C a 15 °C) y un incremento en el fotoperiodo (10:00 a 13:00 h-L) dentro el periodo diciembre-abril, marca el inicio de la temporada reproductiva para el lenguado de California en la zona de Bahía Magdalena. Esto se ve reflejado con el incremento en los niveles de concentración de las vitelinas y esteroides en sangre (Tabla XVI). La disminución de dichos niveles coincide con un incremento en la temperatura (15°C a 20 °C) y un descenso el

fotoperiodo (13:00 a 12:00) dentro el periodo junio-agosto. Con lo que se podría presumir como el término de la temporada reproductiva. Estos resultados concuerdan parcialmente con *Rhodeus ocellatus ocellatus* (Shimizu et al., 1994), donde se reporta que el inicio de la temporada reproductiva está en relación con un incremento en la temperatura, mientras que el termino de la temporada está en relación con una disminución en el fotoperiodo y un incremento en la temperatura. Por el contrario, especies que desovan en temporada de verano muestran una fuerte correlación con altas temperaturas y fotoperiodos largos, mientras que para especies que desovan en otoño es a la inversa. Sin embargo, estos factores pueden variar entre especies que desovan para un mismo periodo y al parecer están en función de la latitud (Wang et al., 2001). Por lo tanto, en función a los resultados obtenidos en este estudio para *P. californicus*, tanto el fotoperiodo como la temperatura juegan un papel importante en la sincronización del proceso reproductivo (Munro, 1990; Redding y Patiño, 1993). Esto se ha observado en algunas especies de ciprinidos y scianidos (Peter y Yu, 1997), donde la maduración final y ovulación ocurre cuando hay un incremento en la temperatura de 12 °C a 20°C. Podemos concluir que el periodo de desove en *P. californicus* inicia por efecto de un incremento en el fotoperiodo y una disminución de la temperatura del agua a finales enero (invierno) y termina por una disminución en el fotoperiodo y un aumento en la temperatura del agua a finales de junio (verano), aun que se observan algunos pocos desoves a finales de julio y agosto.

La calidad del agua es un aspecto que debe ser tomado en cuenta tanto en las poblaciones nativas como en las especies bajo cautiverio. Cambios ambientales bruscos o condiciones fuera del rango óptimo, puede resultar en una reducción de la calidad del

agua y por lo tanto puede verse afectado el éxito reproductivo (Muron, 1990). La salinidad del agua es uno de los factores que conforman dicha calidad del agua. Por lo que en el presente trabajo, se evaluó el posible efecto de la salinidad sobre los cambios en los niveles de las vitelinas y de los esteroides sexuales en *P. californicus*. Durante la temporada de muestreo se observó una variación en la salinidad del agua con un intervalo de 35 ppm a 37 ppm (Fig. 18 a). Dicha variación muestra que los niveles máximos de vitelinas y esteroides se observan cuando la salinidad del agua está entre 36 ppm y 37 ppm, mostrando una diferencia significativa con los niveles observados a una salinidad de 35 ppm (Tabla XX). Sin embargo los resultados obtenidos del análisis ANCOVA muestran que los cambios en la salinidad del agua no establecen una correlación directa con el proceso reproductivo en el lenguado de California, es decir, con los cambios en los niveles de las vitelinas y esteroides sexuales. Ya que el factor peso corporal mostró también tener un efecto sobre los niveles de las vitelinas dentro del análisis ANCOVA pero no sobre los niveles de los esteroides sexuales (Tabla XXI). Por lo que es posible que se trate de un efecto indirecto de la salinidad o una combinación de ambos factores. Por otro lado, es muy probable que los cambios en la salinidad estén mejor relacionados con cambios climáticos (fotoperiodo y temperatura) (Duncan *comp. per.*) y presenten un efecto efímero o poco significativo sobre el proceso reproductivo ya que existe poca evidencia científica que sustente una adaptación de los reproductores sobre su ciclo reproductivo a los cambios de salinidad y es improbable que los cambios temporales de salinidad sean empleados como indicadores, excepto quizás en condiciones salobres (Bye, 1990) o en especies anodromas, o en algunas tilapas (Watanabe, 2000). Donde la salinidad puede tener un efecto sobre el desarrollo gonadal ya que un incremento ligero puede inhibir el desarrollo y esto puede ser

atribuido a un cambio en los niveles de calcio como se vio en *P. innesi* (Lam, 1983). También, se ha visto que la salinidad puede influir en la actividad biológica de los esteroides, reduciendo su actividad como se observó en un estudio *in vitro* realizado con ovocitos de trucha arco iris (Fostier et al., 1983). Sin embargo, los cambios en la salinidad del agua están más estrechamente correlacionados con la supervivencia de la progenie y con la flotabilidad de los huevos que con el proceso reproductivo en si. A pesar de que en un estudio realizado con *Pleuronectus flesus* se observó que los huevos previo al desove eran más largos y tenían una presión osmótica baja si las hembras eran transferidas a aguas con baja salinidad algunas semanas previo al desove. La baja presión osmótica de la sangre de la madre probablemente contribuyó a un incremento en el contenido de agua de los huevos por medio de los fluidos ováricos. Esto indica que la respuesta de los padres a la salinidad puede resultar en una gravidez específica alterada para los huevos el cual puede influir en la supervivencia en aguas salobres (Holliday, 1969).

En el presente estudio se pudo establecer que el 76% de las hembras capturadas durante el periodo enero-abril eran maduras, basado en el perfil del nivel de concentración de vitelinas, esteroides y características morfológicas de la gónada. Así pues, el patrón de desarrollo gonadal en el lenguado de California es, en términos generales, similar al de otros peces planos. Por lo que a partir de criterios histológicos y el perfil de los niveles de esteroides y vitelinas nos permitirán dividir a los peces entre las diferentes categorías reproductivas (inmaduro, madurando, maduro) y determinar el estatus reproductivo del pez. Esta información junto con el manejo de parámetros ambientales nos será de utilidad para la construcción de programas de maduración en

acuicultura y/o poblaciones nativas. Nos permitirá a su vez, incrementar nuestra habilidad en seleccionar reproductores en cautiverio para obtener niveles aceptables de huevos fertilizables y una alta producción de larvas equivalentes a las que se pueden obtener de hembras silvestres y ver hasta qué punto las manipulaciones ambientales y/u hormonales pueden afectar al proceso vitelogénico. Finalmente, más estudios son necesarios para comprender la fisiología y endocrinología de la especie como son la determinación del tiempo de duración de cada fase del desarrollo gonadal así como la posible influencia de otros esteroides que puedan estar involucrados en el ciclo reproductivo.

9. CONCLUSIONES

1. Se establecieron ocho estadios de desarrollo gonadal englobados en cinco fases para hembras silvestres de lenguado de California.
2. Se estableció un análisis ELISA que permitirá evaluar cambios en los niveles de las vitelinas durante el ciclo reproductivo en hembras del lenguado de California.
3. Se observó una variación en los niveles de vitelinas implicadas en el crecimiento de los ovocitos durante la temporada reproductiva en hembras del lenguado de California.
4. Se estableció una correlación entre los niveles de las hormonas esteroides y vitelinas con el desarrollo gonadal durante la temporada reproductiva en hembras el lenguado de California.
5. Se estableció una correlación entre los parámetros ambientales fotoperiodo y temperatura sobre el ciclo reproductivo permitiendo así marcar el inicio y termino de la temporada reproductiva para hembras del lenguado de California en la zona de Bahía Magdalena, B.C.S., México.

10. REFERENCIAS.

- Ahlstrom**, E.H., K. Amvak, D.A Hensley, G.H. Moser and B.Y. Sumida. 1983. Pleuronectiformes: Development. **In:** Moser, H.G., W.J. Richards, D.M. Cohen, M.P. Fahay, A.W. Kendall, jr. and S.L. Richardson (eds.). Ontogeny and systematic of fishes. Vol. III. *Int. Symp.*, La Jolla, CA, USA. 640-670.
- Allen**, M.J. 1990. The biological environment of the California halibut *Paralichthys californicus*. *Fish Bulletin*. 174: 7-29.
- Arcos**, G.F., A.M. Ibarra, C. Vázquez-Boucard, E. Palacios and I.S. Racotta. 2003. Hemolymph metabolic variables in relation to eyestalk ablation and gonad development of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. *Aqua. Res.* **In press.**
- Balestra**, M., E.A. Ferrero, P. Giulianini, R. Marzari, D. Ota e R. Patzner. 1989. Caratterizzazione biochimica delle proteine del turolo e correlazione con le condizioni de maturita di *Zosterisessor ophiocephalus* (Pises: Gobiidae). *Nova Thalassia*. 10(1): 627-629.
- Barcellos**, L.J.G., G.F. Wassermann, A.P. Scott, V.M. Woehl, R.M. Quevedo, I. Ittzés. M.H. Krieger and F. Lulhier. 2001. Steroid profiles in culture female jundiá, the Siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces Teleostei) during the first reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 121: 325-332.
- Barrett**, J.T. 1985. *Inmunología*. Interamericana. México. 507 pp.
- Barsky**, K.C. 1990. History of the commercial California halibut fisheries. **In:** C. Haugen (ed.). The California halibut, *Paralichthys californicus*, resource and fisheries. State of California, The Resources Agency, Departament of Fish and Game. *Fish Bulletin*. 174: 217-227.
- Bayliss**, H.O. 1984. Lipid histochemistry (Microscopy handbooks;6). Departament of pathology, Guy's Hospital Medical School London. Oxford University Press. Royal Microscopical Society. 68 pp.
- Berlinsky**, D.L. and J.L. Specker. 1991. Changes in gonadal hormones during oocyte development in the striped bass *Morone saxatilis*. *Fish Physiol. Biochem.* 9(1):51-62.
- Bhakta**, M. and P. Nath. 1996. Isolation and identification of yolk proteins in Indian major carp, *Labeo rohita*. *J. Biosci.* 21(5): 711-722.

- Blythe, W.G., L.A. Hlfich and C.V. Sullivan.** 1994. Sex steroid hormone and vitellogenin levels in striped bass (*Morone saxatilis*) maturing under 6-, 9- and 12-month photothermal cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 94: 122-134.
- Brown-Peterson, N., P. Thomas and C.R. Arnold.** 1988. Reproductive biology of the spotted seatrout *Cynoscion nebulosus* in south Texas. *Fishery Bull.* 86(2): 373-388.
- Burgos-Aceves, M. A.** 2001. Identificación, purificación y caracterización de vitelinas en hembras maduras del lenguado de California *Paralichthys californicus*, Ayres 1859 (Pisces: Paralichthyidae). Tesis Lic. UABCS. México.
- Bye, V.J.** 1990. *Temperate marine teleost.* In: Munro, A.D., A.P. Scott and T.J. Lam (eds.). Reproductive Seasonality in teleosts: Environmental influences. CRC perss. USA. 125-143.
- Caddell, S.M., D.M. Gadomski and L.R. Abbott.** 1990. Induced spawning of the California halibut *Paralichthys californicus* (Pisces: Paralichthyidae) under artificial and natural conditions. *Fish Bulletin.* 174: 175-198.
- Campbell, C.M., J.M. Walsh and D.R. Idler.** 1976. Steroids in the plasma of the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus* Walbaum). A seasonal study and investigation of steroids involvement in oocyte maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 29:14-20
- Carnevali, O., G. Mosconi, A. Roncarati, M. Romano and L. Limatola.** 1992. Changes in the electrophoretic pattern of the yolk proteins during vitellogenesis in the gilthead sea bream *Sparus aurata* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 103B: 955-962.
- Castillo-Sánchez, E., J.A. Rosales-Casián y G. Pérez-Ponce de León.** 1998. Helminths parasites of *Paralichthys californicus* (Osteichthyes: Paralichthyidae) en el estero de Punta Banda, Bahía de Todos Santos y Bahía de San Quintín, Baja California, México. *Ciencias Marinas* 24(4): 443-462.
- Chang, C.F., S.R. Jeng, M.N. Lin and Y.Y. Tin.** 1996. Purification and characterization of vitellin from the mature ovaries of prawn, *Penaeus chinensis*. *Inv. Rep. Develop.* 29(2): 87-93.
- Colombo, L., S. Pasavento and D.W. Jonson.** 1972. Patterns of steroid metabolism in teleost and ganoid fishes. *Gen. Comp. Endocrinol. Supp.* 3:245-253.

- Comish, D.A.** 1998. Seasonal steroid hormone profiles in plasma and gonad of the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Water SA*. 24(3): 257-263.
- Copeland, P.** and P. Thomas. 1988. The measurement of plasma vitellogenin in a marine teleost, the spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*) by homologous radioimmunoassay. *Comp. Biochem. Physiol.* 91B: 17-23.
- Crim, L.W., E.G. Watts and E.M. Donaldson.** 1973. Radioimmunoassay estimates of plasma gonadotropins levels in the spawning pink salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* 21: 62-70.
- Daniel, W.W.** 1995. Bioestadística. UTHEA. México. 878 pp.
- Dawson, A.** 1998. Comparative reproductive physiology of non-mammalian species. *Pure Appl. Chem.* 70(9): 1657-1669.
- De Vlaming, V, G. Grossman and F. Chapman.** 1982. On the use of the gonosomatic index. *J. Fish Physiol.* 1: 31-39.
- De Vlaming, V.** 1983. *Oocyte development patterns and hormonal involvements among teleosts.* In: Rankin, J.C., T.J. Pitcher and R.T. Duggan (eds.). Control processes in fish physiology. Wiley-Interscience. U.S.A. 176-199.
- Eckstein, B.** 1970. Metabolic pathways of steroids biosynthesis in ovarian tissue of a teleost, *Tilapia aurea*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 14: 303-312.
- 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.
- Fostier, A., R. Billard, B. Breton and Y. Zohar.** 1983. *The gonadal steroids.* In: Hoar, W.S., D.J. Randall and E.M. Donaldson (eds). Fish Physiology Vol. 9A. Academic Press. U.S.A. 277-372.
- Fostier, A. And B. Jalabert.** 1986. Steroidogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at various preovulatory stage: changes in plasma hormone levels and in vivo and in vitro responses of the ovary to salmon gonadotropin. *Fish Physiol. Biochem.* 2(1-4): 87-99.
- Gadomski, D.M., S.M. Caddell, L.R. Abbott and T.C. Caro.** 1990 Growth and development of larval and juvenile California halibut, *Paralichthys californicus*, reared in the laboratory. *Fish Bulletin.* 174: 85-97.

- García-Franco**, W., J.T. Silva-Hernández, M.S. De la Rosa y J.A. Figueroa. 1998. *Catálogo de especies marinas de Baja California*. Dirección de Pesca. Gobierno del Estado de Baja California. 130 p.
- Greeley**, M.S., D.R. Calder and R.A. Wallace. 1986. Changes in teleost yolk proteins during oocyte maturation: correlation of yolk proteolysis with oocyte hydration. *Com. Biochem. Physiol.* 84B(1): 1-9.
- Goetz**, F.W. 1983. Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes. **In:** Hoar, W.S., D.J. Randall and E.M. Donaldson (eds.). *Fish physiology*. Vol. IX part B. Academic press. U.S.A. 117-170.
- Giulianini**, P.G., A. Di Marcotullio, E.A. Ferrero and R.A. Patzner. 1994. Light microscopical and ultrastructural cytology of the ovaries in the sea-grass goby *Zosterisessor ophiocephalus* (Osteichthyes, Gobiidae). *Boll. Zool.* 61: 135-144.
- Haaker**, P.L. 1975. The biology of the California halibut *Paralichthys californicus* (Ayres) in Anaheim bay. **In:** Lane, E.D. and C.W. Hill (eds). The Marine resources of Anaheim bay. *Fish Bull.* 165: 137-153.
- Hara**, A., C.V. Sullivan and 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.
- Harmin**, S.A, L.W. Crim and M.D. Wiegand. 1995. Plasma steroid profiles and the seasonal reproductive cycle in male and female winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Mar. Biol.* 121: 601-610.
- Hartling**, R.C., J.J. Pereira and J.G. Kunkel. 1997. Characterization of a heat-stable fraction of lipovitellin and development of an immunoassay for vitellogenin and yolk protein in winter flounder (*Pleuronectes americanus*). *J. Exp. Zool.* 278: 156-166.
- Heppell**, S.A. and C.V. Sullivan. 1999. Gag (*Mycteroperca microlepis*) vitellogenin: purification, characterization and use for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of female maturity in three species of grouper. *Fis Physiol. Biochem.* 20: 361-374.
- Holliday**, F.G.T. 1969. *The effect of salinity on the eggs and larvae of teleosts*. **In:** Hoar, W.S. and D.J. Randall (eds). *Fish Physiology* Vol. 1. Academic Press. E.U.A. 293-311.

- Humanson, G.L.** 1972. *Animal Tissue Techniques*. 3a Ed. W.H. Freeman and Company. San Francisco.
- Htun-Han,** 1978. The reproductive biology of the dab *Limanda limanda* (L.) in the North Sea. Seasonal changes in the ovary. *J. Fish Biol.* 13: 351-359.
- Hyllner, S.J., B. Norberg and C. Haux.** 1994. Isolation, partial characterization, induction and the occurrence in plasma of the major vitellin envelope proteins in the atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) during sexual maturation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51: 1700-1707.
- Innis, D.B.** 1990. Juvenile California halibut *Paralichthys californicus*, growth in relation to thermal effluent. *Fish Bulletin.* 174: 153-165.
- Instituto Nacional de Pesca.** 1999. Anuario Estadístico de Pesca. Subsecretaría de Pesca, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <http://respesc.semarnap.gob.mx:8891/>.
- Johanning, K.M. and J.L. Specker.** 1995. Characterization of yolk proteins during oocyte development of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 112B(2): 177-189.
- Johnsen, H.K., H. Tveiten, N.P. Willassen and A.M. Arnesen.** 1999. Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) vitellogenin: development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay. *Comp. Biochem. Physiol.* 124B: 355-362.
- Johnson, L.L., E. Casillas, M.S. Myers, L.D. Rhodes and O.P. Olson.** 1991. Patterns of oocyte development and related changes in plasma 17 β -estradiol, vitellogenin, and plasma chemistry in English sole *Paraphrys vetulus* Girard. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 152: 161-185.
- Kagawa, H., G. Young, S. Adachi and Y. Nagahama.** 1982. Estradiol-17 β production in Amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) ovarian follicles: Role of the thecal and granulosa cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* 47:440-448.
- Khoo, K.H.** 1979. The histochemistry and endocrine control of vitellogenesis in goldfish ovaries. *Can. J. Zool.* 57:617-626.
- Kime, D.E., J.P. Nash and A.P. Scott.** 1999. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. *Aquaculture* 177: 345-352.

- Kjesbu, O.S., H. Kryvi and B. Norberg.** 1996. Oocyte size and structure in relation to blood plasma steroid hormones in individually monitored, spawning Atlantic cod. *J. Fish Biol.* 49: 1197-1215.
- Kokokiris, L. B. Mourot, F. Le Menn, M. Kentouri and A. Fostier.** 2000. Endocrine changes during the annual reproductive cycle of the red porgy *Pagrus pagrus* (Teleostei, Sparidae). *Fish Physiol. Biochem.* 23: 1-11.
- Kucas, S.T., and T.J. Hassler.** 1986. Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Pacific southwest) California halibut. U.S. Fish Wildlife Serv. *Biol. Rep.* 82(11.44): 8.
- Lam, T.J.** 1983. *Environmental influences on gonadal activity in Fish.* **In:** Hoar, W.S., D.J. Randall and E.M. Donaldson (eds). *Fish Physiology* Vol. 9B. Academic Press. E.U.A. 65-116.
- Lamba, V.J., S.V. Goswami and B.I. Dundararaj.** 1982. Radioimmunoassay for plasma cortisol, testosterone, estradiol-17b, and estrone in the catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch): Development and validation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 47: 170-181.
- Larsson, D.G., I. Mayer, S.J. Hyllner and L. Förlin.** 2002. Seasonal variation of vitelline envelope proteins, vitellogenin and sex steroids in male and female Eelpout (*Zoarces viviparus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 125: 184-196.
- Liu, H.W., R.R. Stickney and W.W. Dickhoff.** 1991. Changes in plasma concentration of sex steroids in adult Pacific halibut, *Hippoglossus stenolepis*. *J. World Aqua. Soc.* 22(1): 30-35.
- Lomax, D.P., W.T. Roubal, J.D. Moore and L.L. Johnson.** 1998. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring vitellogenin in English sole (*Pleuronectes vetulus*): development, validation and cross-reactivity with other pleuronectids. *Comp. Biochem. Physiol.* 121B: 425-436.
- Love, M.S. and A. Brooks.** 1990. Size and age at first maturity of the California halibut *Paralichthys californicus*, in the southern California bight. **In:** The California halibut, *Paralichthys californicus*, resource and fisheries. *California Fish and Game Fisheries Bulletin.* 174: 167-174.

- MacNair**, L.S., M.L. Domeier and C.S.Y. Chun. 2001. Age, growth and mortality of California halibut *Paralichthys californicus*, along southern and central California. *Fish. Bull.* 99: 588-600.
- Malison**, J.A., L.S. Procarione, T.P. Barry, A.R. Kapuscinski and T.B. Kayes. 1994. Endocrine and gonadal changes during the annual reproductive cycle of freshwater teleost, *Stizostedion vitreum*. *Fish Physiol. Biochem.* 13(6): 473-484.
- Mañanós**, E., J. Núñez, S. Zanuy, M. Carrillo and F. Le Menn. 1994. Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin. II-Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Comp. Biochem. Physiol.* 107B(2): 217-223.
- Mathews**, C.K. y K.E. Van Holde. 1998. *Bioquímica*. McGraw-Hill-Interamericana. España. 1283 pp.
- Matsubara**, T. and Y. Koya. 1997. Course of proteolytic cleavage in three classes of yolk proteins during oocyte maturation in Barfin flounder *Verasper moseri*, a marine teleost spawning pelagic eggs. *J. Exp. Zool.* 278: 189-200.
- Matsubara**, T., N. Ohkubo, T. Andoh, C.V. Sullivan and A. Hara. 1999. Two forms of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of Barfin flounder, *Veraper moseri*, a marine teleost that spawns pelagic eggs. *Developmental Biol.* 213: 18-32.
- Matsuyama**, M., S. Adachi, Y. Nagahama and S. Matsuura. 1988. Diurnal Rhythm of oocyte development and plasma steroids hormone level in the female red sea bream *Pargus major* during the spawning season. *Aquaculture* 73: 357-372.
- Matsuyama**, M., S. Adachi, Y. Nagahama, K. Maruyama and S. Matsuura. 1990. Diurnal rhythm of serum steroid hormone levels in the Japanese whiting, *Sillago japónica*, a daily-spawning teleost. *Fish Physiol. Biochem.* 8: 329-338.
- Merson**, R.R., C.S. Casey, C. Martinez, B. Siffientino, M. Chandlee and J.L. Specker. 2000. Oocyte development in summer flounder: seasonal changes and steroid correlates. *J. Fish Biol.* 57: 182-196.
- Mellinger**, J. 2002. *Sexualité et Reproduction des Poisson*. CNRS Editions. Francia. 349 pp.
- Methven**, D.A., L.W. Crim. B. Norberg. J.A. Brown, G.P. Goff and I. Huse. 1992. Seasonal reproduction and plasma levels of sex steroids and vitellogenin in

- atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49: 754-759.
- Mojazi**, A.B., M. Maebayashi, A. Hara, S. Adachi and K. Yamauchi. 1996. Ovarian development and serum sex steroid and vitellogenin profiles in the female cultured sturgeon hybrid, the bester. *J. Fish Biol.* 48: 1164-1178.
- Mommens**, T.P. and P.J. Walsh. 1988. *Vitellogenesis and oocyte assembly*. **In:** Hoar, W.S. and D.J. Randall (eds). *Fish Physiology Vol. 10A*. Academic Press. E.U.A. 347-406.
- Munro**, A.D. 1990. *General Introduction*. **In:** Munro, A.D., A.P. Scott and T.J. Lam (eds.). *Reproductive Seasonality in teleosts: Environmental influences*. CRC perss. USA. 1-11.
- Nagahama**, Y. 1983. *The funtional morphology of teleost gonads*. **In:** Hoar, W.S., D.J. Randall and E.M. Donaldson (eds). *Fish Physiology Vol. 9A*. Academic Press. E.U.A. 223-275.
- Nagler**, J.J., S.M. Ruby, D.R.I. Idler and Y.P. So. 1987. Serum phosphoprotein phosphorus and calcium levels as reproductive indicators of vitellogenin in highly vitellogenic mature female and estradiol-injected immature rainbow trout (*Salmo giardneri*). *Can. J. Zool.* 65: 2421-2425.
- Nagler**, J.J. and 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.
- Ng**, T.B. and D.R. Idler. 1983. *Yolk formation and differentiation in teleost fishes*. **In:** Hoar, W.S., D.J. Randall and E.M. Donaldson (eds). *Fish Physiology Vol. 9A*. Academic Press. E.U.A. 373-404.
- Norberg**, B., B.T. Björnsnsson, C.L. Brown, U.P. Wichard, L.J. Deftos and C. Haux. 1989. Changes in plasma vitellogenin, sex steroids, calcitonin and thyroid hormones related to sexual maturation in female brown trout (*Salmo trutta*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 75: 316-326.
- Norberg**, B., V. Valkner, I. Huse, I. Karlsen and G. Grung. 1991. Ovulatory rythms and egg viability in the atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) *Aquaculture* 97(4): 365-371.

- Norberg, B.** 1995. Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) vitellogenin: induction, isolation and partial characterization. *Fish Physiol. Biochem.* 14(1): 1-13.
- Oda, D.** 1991. Development of eggs and larvae of California halibut *Paralichthys californicus* and Fantail sole *Xystreurys liolepis* (Pisces: Paralichthyidae). *Fishery Bulletin* 89(3): 387-402.
- Ouchterlony, O.** 1948. Antigen-antibody reaction in gels. *Arkiv. Kemi. Mineral Geol.* 26B: 14
- Pankhurst, N.W. and A.M. Cornoy.** 1987. Seasonal change in reproductive condition and plasma levels of sex steroids in the blue cod *Parapercis colias* (Bloch and Schneider) (Mugiloididae). *Fish Physiol. Biochem.* 4(1):15-26.
- Pankhurst, N.W. and A.M. Cornoy.** 1988. Endocrine changes during gonadal maturation and spawning in the orange roughy (*Hoplostethus atlanticus* Collett), a teleost from the midslope waters off New Zealand. *Gen. Comp. Endocrinol.* 70: 262-273.
- Pavlidis, M., L. Greenwood, B. Mourot, C. Kokkari, F. Le Menn, P. Divanach and A.P. Scott.** 2000. Seasonal variation and maturity stages in relation to differences in serum levels of gonadal steroid, vitellogenin and thyroid hormones in the Common dentex (*Dentex dentex*). *Gen. Comp. Edocrinol.* 118: 14-25.
- Person-Le Puyet, J.** 1990. *Sole and Turbot culture*. In: Barnabé, G. (ed.). *Aquaculture* Vol. 2. Ellis Horwood. England. 687-734.
- Peter, R.E.** 1983. *The Brain and Neurohormones in teleost reproduction*. In: 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. and K.L. Yu.** 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. *Rev. Fish Biol. Fish.* 7: 173-197.
- Prat, F., S. Zanuy, M. Carrillo, A. De Mones and A. Fostier.** 1990. Seasonal changes in plasma levels of gonadal steroids of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 78: 361-373.
- Pottinger, T.G. and TR. Carrick.** 2000. Indicators of reproductive performance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) selected for high and low responsiveness to stress. *Aquaculture Research.* 31:367-375.

- Powell, J.** 2000. Overview of maturation in fish: Part 1. *Northern Aquaculture*.
- Rahman, S., A. Takemura and K. Takano.** 2000. Annual changes in testicular activity and plasma steroid hormones in the golden rabbitfish *Siganus guttatus* (Bloch). *Fish. Sci.* 66: 894-900.
- Redding, J.M. and R. Patiño.** 1993. *Reproductive Physiology*. In: Evans, D.H (ed). The Physiology of Fishes. U.S.A.
- Reis-Henriques, M.A., M. Ferreira, L. Silva and A. Dias.** 2000. Evidence for an involvement of vitellogenin in the steroidogenic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) vitellogenic oocyte. *Gen. Comp. Endocrinol.* 117: 260-267
- Rinchard, J., P. Kestemont, E.R. Kühn and A. Fostier.** 1993. Seasonal changes in plasma levels of steroids hormones in an asynchronous fish the gudgeon *Gobio gobio* L. (Teleostei, Cyprinidae). *Gen. Comp. Endocrinol.* 92:168-178.
- Rosenblum, P.M., J. Pudney and I.P. Callard.** 1987. Gonadal morphology, enzyme histochemistry and plasma steroid levels during the annual reproductive cycle of male and female brown bullhead catfish, *Ictalurus nebulosus* Lesueur. *J. Fish Biol.* 31: 325-341.
- Safford, S.E. and P. Thomas.** 1987. Effects of capture and handling on circulating levels of gonadal steroids and cortisol in the spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*.
- Schafhauser-Smith, D. and T.J. Benfey.** 2002. The purification and development of a quantitative enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the measurement of vitellogenin in diploid and triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Fish Physiol. Biochem.* 24: 287-298.
- Scott, A.P., V.J. Bye and S.M. Baynes.** 1980. Seasonal variation in sex steroids of female rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *J. Fish Biol.* 17: 587-592.
- Sheehan, D., Hrapchak B.** 1980. Theory and practice of Histotechnology. 2nd Ed., Battelle Press, Ohio. 173-174 pp
- Shimizu, A., K. Aida, I. Hanyu.** 1994. Effects of photoperiod and temperature on gonadal activity and plasma steroid levels in an autumn spawning bitterling, *Acheilognathus rhombea*, during different phases of its annual reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 93: 137-150.

- Silversand, C., B. Norberg and C. Haux.** 1996. Fatt-acid composition of ovulated eggs from wild and cultured turbot (*Scophthalmus maximus*) in relation to yolk and oil globule lipids. *Mar. Biol.* 125:296-278.
- Susca, V., A. Corriero, C.R. Bridges and D.G. De Metro.** 2001. Study of the sexual maturity of female bluefin tuna: purification and partial characterization of vitellogenin and its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Fish Biol.* 58: 815-831.
- Smith, J.S. and P. Thomas.** 1991. Changes in hepatic estrogen-receptor concentrations during the annual reproductive and ovarian cycle of a marine teleost, the Spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 81: 234-245.
- Tait, M.J. and R.W. Hickman.** 2001. Reproduction, gamete supply and larval rearing of New Zealand turbot *Colistium nudipinnis* (Waite 1910) and brill *Colistium guntheri* (Hutton 1873): a potential new aquaculture species. *Aqua. Res.* 32: 717-725.
- Takemura, A. and M. Oka.** 1998. Immunochemical sexing of living yellow fin tuna, *Thunnus albacares* (Bonnaterre), using a vitellogenin-like protein. *Aquaculture Research.* 29: 245-249.
- Tao, Y., A. Hara, R.G. Hodson, L.C. Woods and C.V. Sullivan.** 1993. Purification, characterization and immuno assay of striped bass (*Morone saxatilis*) vitellogenin. *Fish Physiol. Biochem.* 12(1): 31-46.
- Torres-Orozco, B. R.E.** 1991. *Los peces de México*. AGT Editor. México. 235pp.
- Tupen, J.W.** 1990. Movement and growth of tagged California halibut *Paralichthys californicus* of the central coast of California. *Fish Bulletin.* 174:199-206.
- Tyler, C.R. and J.P. Sumpter.** 1990. The purification and partial characterization of carp, *Cyprinus carpio*. *Fish Physiol. Biochem.* 8(2): 111-120.
- Tyler, C.R. and J.P. Sumpter.** 1996. Oocyte growth and development in teleost. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 6: 287-318.
- Ueda, H., O. Hirió, A. Hara, K. Yamauchi and Y. Nagahama.** 1984. Changes in serum concentration of steroid hormone, thyroxine and vitellogenin during spawning migration of the Chum Salmon, *Oncorhynchis keta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 53: 203-211.

- Vázquez-Boucard**, C.G., P. Levy, H.J. Ceccaldi and C.H. Brogren. 2002. Developmental changes in concentration of vitellin, vitellogenin and lipids in hemolymph, hepatopancreas and ovaries from different ovarian stages of Indian white prawn *Fenneropenaeus indicus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 281: 63-75.
- Wallace**, R.A. and K. Selman. 1979. Physiological aspects of oogenesis in two species of stricklebacks, *Gastrosteus aculeatus* (L.) and *Apeltes quadracus* (Mitchill). *J. Fish Biol.* 14: 551-564.
- Wallace**, R.A. and K. Selman. 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Amer. Zool.* 21:325-343.
- Wang**, H.Y., Ch.F. Weng, M.Ch. Tu and S.Ch. Lee. 2001. Synchronization of plasma sexual steroid concentration and gonadal cycles in the Sleeper, *Eleotris acanthopoma*. *Zool. Studies.* 40(1): 14-20.
- Watanabe**, W.O. 2000. *Salinity*. In: Strickney, R.R. (ed). Encyclopedia of aquaculture. Wiley-InterScience. U.S.A. 767-772.
- Wiley**, H.S., L. Opresko and R.A. Wallace. 1979. New methods for the purification of vertebrate vitellogenin. *Anal. Biochem.* 97: 145-152.
- Wingfield**, J.C. and A.S. Crimm. 1977. Seasonal changes in plasma cortisol, testosterone and oestradiol-17 β in the plaice, *Pleuronectes platessa* L. *Gen. Comp. Endocrinol.*
- Yalow**, R.S. 1978. Radioimmunoassay: A probe for the fine structure of biological system. *Science.* 200: 1236-1245.
- Young**, G., L.W. Crim, H. Kagawa and A. Kambegawa. 1983. Plasma 17 α ,20 β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one levels during sexual maturation of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*): Correlation with plasma gonadotropin and *in vitro* production by ovarian follicles. *Gen. Comp. Endocrinol.* 51: 96-105.
- Zar**, J.H. 1999. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall. U.S.A. 663 pp.
- Zohar** , Y. and C.C. Mylonas. 2001. Endocrine manipulation of spawning in cultured fish: from hormone to genes. *Aquaculture.* 197: 99-136.

Apéndice A

Formulación del (a) fijador Davidson's y de las diferentes soluciones y colorantes utilizados en la técnica clásica histológicas de tinción con (b) Hematoxilina-Eosina y las técnicas histoquímicas (c) Azul alciano-PAS y (d) Sudán Negro.

Colorante / Solución	Reactivo	Cantidad
(a) Davidson's	Glicerina	10%
	Formaldehído 37%	20%
	Etanol 95%	30%
	Agua de mar filtrada	30%
	Ácido acético (1:9)	10%
(b, c, d) Hematoxilina de Harris	Hematoxilina cristales	5 g
	Etanol 100%	50 mL
	Sulfato de aluminio y potasio	100 g
	Agua destilada	1000 mL
	Oxido de Mercurio	2.5 g
(b) Eosina	Sol. acuosa de eosina 1%	100 mL
	Sol. acuosa de floxina 1%	10 mL
	Etanol 95%	780 mL
	Ácido acético glacial	4 mL
(b) Alcohol ácido	Etanol 70%	1000 mL
	HCl conc.	10 mL
(b) Agua amoniacal	Agua destilada	1000 mL
	NH ₄ OH	2 mL
(c) Ácido acético 3%	Ácido acético glacial	3 mL
	Agua destilada	97 mL
(c) Agua sulfurosa	Metabisulfito de sodio 10%	6 ml
	HCl 1N	5 mL
	Agua destilada	100 mL
(c) Azul alciano	Azul alciano 8 GX	1 g
	Ácido acético glacial 3%	100 mL
(c) Reactivo de Schiff	Fucsina básica	1 g
	Agua destilada	200 mL
	HCl 1N	20 mL
	Metabisulfito de sodio	1 g
	Carbón activado	0.5 g
(d) Sudán Negro	Alcohol etílico 70%	100 mL
	Sudan Negro B	A saturación