



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS  
MARINAS



**APLICACIÓN DE LA ESTEREOLOGÍA PARA LA  
DETERMINACIÓN DE LA FECUNDIDAD  
PARCIAL DE LA SARDINA MONTERREY,  
*Sardinops sagax* (Jenyns, 1842) (*Teleostei:*  
*Clupeidae*).**

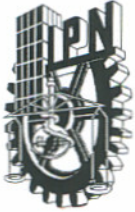
**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
EN  
MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

**PRESENTA**

**BERTHA LIDUVINA PEREZGOMEZ ALVAREZ**

**La Paz, B.C.S. junio 2008.**



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
*ACTA DE REVISION DE TESIS*

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 16 del mes de Mayo del 2008 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

“APLICACIÓN DE LA ESTEREOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA FECUNDIDAD PARCIAL DE LA SARDINA MONTERREY, *Sardinops sagax* (JENYNS, 1842) (Teleostei:Clupeidae)”

Presentada por el alumno:

**PEREZGÓMEZ**  
Apellido paterno

**ÁLVAREZ**  
materno

**BERTHA LIDUVINA DEL ESPÍRITU SANTO**  
nombre(s)

Con registro: 

B	0	4	1	2	0	2
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

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

**LA COMISION REVISORA**

Director de tesis  
PRIMER VOCAL

\_\_\_\_\_  
DRA. ROSA ISABEL OCHOA BÁEZ

PRESIDENTE

\_\_\_\_\_  
DR. DANIEL LLUCH BELDA

SECRETARIO

\_\_\_\_\_  
DR. JOSÉ DE LA CRUZ AGÜERO

SEGUNDO VOCAL

\_\_\_\_\_  
MC. GUSTAVO DE LA CRUZ AGÜERO

TERCER VOCAL

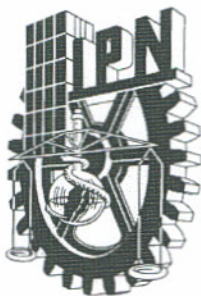
\_\_\_\_\_  
DR. JULIÁN RENÉ TORRES VILLEGAS

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

\_\_\_\_\_  
DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE



IPN  
CICIMAR  
DIRECCION



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 2 del mes Junio del año 2008, el (la) que suscribe BERTHA LIDUVINA DEL ESPÍRITU SANTO PEREZGOMEZ ÁLVAREZ alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS con número de registro B041202 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de: DRA. ROSA ISABEL OCHOA BAEZ y cede los derechos del trabajo titulado: "APLICACIÓN DE LA ESTEREOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA FECUNDIDAD PARCIAL DE LA SARDINA MONTERREY, *Sardinops sagax* (JENYNS, 1842) (Teleostei:Clupeidae)" al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: lpga22@yahoo.com.mx rochoa@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
BERTHA LIDUVINA DEL ESPÍRITU SANTO PEREZGOMEZ ÁLVAREZ  
nombre y firma

*“Every theory of the course of events in nature  
is necessarily based on some process of  
simplification and is to some extent,  
therefore, a fairy tale.”*

*Sir Napier Shaw*

*Para Alfredo y nuestros hijos*

## Agradecimientos

Al Instituto Politécnico Nacional y al CICIMAR, por otorgarme las facilidades para continuar con mi superación académica.

Este trabajo fue realizado gracias a los proyectos: “Indicadores ambientales de abundancia de la sardina monterrey (*Sardinops sagax*) en el Noroeste de México. Febrero 2005 – enero 2006”. Clave SIP 20050632., “Gestión racional del recurso sardina en la costa occidental de la península de Baja California”. SAGARPA-CONAPESCA. Programa Alianza Contigo. Participación por invitación. 2006. Y el proyecto “Sistema de seguimiento de las existencias de biomasa desovante de la sardina monterrey (*Sardinops sagax*) en la costa occidental de Baja California, empleando el método de producción diaria de huevos. Enero – diciembre 2007”, clave SIP20070991, desarrollados en el Laboratorio de Morfofisiología del CICIMAR.

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico otorgado para la realización de los estudios de postgrado.

A la Dra. Rosa Isabel Ochoa Báez, por dirigir este trabajo.... Gracias Rosi, así como a los integrantes del comité revisor: Dr. Daniel Lluch Belda, Dr. José de la Cruz Agüero, Dr. René Torres Villegas, MC. Gustavo de la Cruz Agüero y MC. José Luis Ortiz Galindo, por sus valiosos comentarios y sugerencias para mejorar este documento.

Al MC. Marcial Villarejo por compartirme su experiencia en el campo de la estereología y su ayuda directa en más de una ocasión durante el proceso de este trabajo.

A la MC. Carmen Rodríguez Jaramillo por el afortunado “tip” de utilizar el escáner para obtener la imagen completa de los cortes.

Mil gracias a mi amiga Lorena Arenas, porque gestionó por mí todas las incapacidades médicas que necesité en mis visitas a los quirófanos.... Gracias.

Y a mis queridas amigas “aventureras”.... Aurora, Diana, Silvi, Paty, Sara... su cariño sincero, su apoyo en los momentos difíciles y en los muy difíciles... y muchas otras cosas. Gracias.

GRACIAS también a mi Alfredo por cuidarme, por comprarme el escáner y la laptop... “para que ya termines esa tesis”, y por todo lo demás.... Gracias a mi princesa y a mi piloto, su felicidad es la mía.

## ÍNDICE

Índice	I
Glosario	II
Lista de figuras	VII
Lista de tablas	X
Resumen	XII
Abstract	XIII
Introducción	1
Antecedentes	6
Justificación	12
Objetivos	13
Área de estudio	14
Material y métodos	15
Resultados	29
Discusión	44
Conclusiones	50
Recomendaciones	51
Bibliografía	52

## Glosario

**Alveolo cortical:** Primeras estructuras que se distinguen en el citoplasma del oocito, que aparecen en la fase de crecimiento inicial. Estas estructuras contienen glicoproteínas y enzimas que promueven el endurecimiento en la membrana vitelina para evitar la poliespermia al momento de la fertilización (Tyler y Sumpter, 1996).

**Atresia:** Proceso paulatino de reabsorción del oocito que se lleva a cabo por los elementos especializados del tejido conjuntivo en el ovario (Hunter *et al.*, 1984).

**Auto-diametral:** Procedimiento en el que a través de la medición del diámetro promedio de los oocitos, utilizando tejido en fresco, se obtiene la estimación de la fecundidad potencial. La palabra *auto*, refleja la automatización parcial de la medida de los diámetros de los oocitos dado que se utiliza un analizador de imágenes, y la palabra *diametral* se debe al hecho de que la estimación de la fecundidad se basa en el conteo de los diámetros (Thorsen y Kjesbu, 2001).

**Biomasa desovante:** Fracción de la población que participa en el desove (Parker, 1980).

**Dinámica poblacional:** Conjunto de atributos que interactúan y mantienen en equilibrio a una población.

**Disector físico:** Es la unidad de muestreo para realizar cuantificaciones estereológicas formado por dos cortes planos paralelos, separados por una distancia conocida. Uno de los planos es considerado el marco de referencia para realizar los conteos. (Gundersen, 1988)

**Densidad numérica:** Es el número discreto de objetos por unidad de volumen (Begega *et al.*, 2000)

**Estereología:** Es un grupo de métodos matemáticos relacionados con los parámetros tridimensionales que definen a una estructura, a partir de las medidas que se obtienen en un plano bidimensional de esta estructura (Weibel, 1979)

**Exactitud:** Puntual, fiel, cabal. (Diccionario Oxford, 2001)

**Fecundidad:** Es el número total de oocitos que potencialmente pueden ser producidos por una hembra. Es una estimación del potencial reproductivo de una hembra (Crim y Glebe, 1990).

**Fecundidad diaria específica:** Producción potencial de oocitos por gramo de la población desovante en un desove parcial (Picquelle y Stauffer, 1985).

**Fecundidad relativa:** Número de oocitos por unidad de peso somático (Hunter et al., 1985).

**Fecundidad parcial:** Producción de oocitos por desove parcial (Hunter *et al.*, 1985).

**Fecundidad indeterminada:** Estrategia reproductiva en la cual no se encuentra definido el número de oocitos que serán desovados en la temporada de puesta, ya que el epitelio germinal del ovario se mantiene activo, lo que significa que la producción, madurez y puesta de oocitos se presenta durante toda la temporada de reproducción (Tyler y Sumpter, 1996).

**Folículos post-ovulatorios:** Cicatrices de la ovulación constituidas por las capas epiteliales colapsadas que formaron el folículo, la granulosa y la teca externa. El tiempo transcurrido entre la puesta y el muestreo se estima por la reabsorción de estas estructuras (Hunter *et al.*, 1985).



**Frecuencia de puesta:** Medida relativa del grupo de hembras que participan en la puesta por desove parcial. Estas hembras se identifican por la presencia en sus ovarios de folículos post-ovulatorios. (Hunter y Goldberg, 1980).

**Inclusiones lipídicas:** Cuerpos de lípido que a menudo aparecen en los oocitos durante el estadio de alveolo cortical y continua su producción y acumulación durante todo el crecimiento del oocito (Tyler y Sumpter, 1996).

**Iterópara:** Estrategia reproductiva en donde se agrupa a las especies que se reproducen repetidamente durante su ciclo de vida (Munro, 1990).

**Modelo:** Esquema teórico generalmente en forma matemática, simbólica pero formal de un sistema, elaborado para entender las relaciones funcionales de los componentes del sistema con el objeto de predecir y potencialmente estudiar o controlar el comportamiento del mismo (Diccionario Oxford, 2001).

**Núcleo migratorio:** Etapa del estadio de madurez final del oocito caracterizada por la posición descentrada del núcleo del oocito, lo cual indica la traslación de esta estructura hacia el polo animal. A lo largo de este camino el núcleo pierde la membrana nuclear, con lo que se le conoce como vesícula germinal (Tyler y Sumpter, 1996).

**Oocitos hidratados:** Última etapa de la madurez final del oocito caracterizada por un rápido incremento en el diámetro del oocito (0.95 a 1.2 mm), la disolución de los glóbulos de vitelo los cuales enmascara prácticamente todas las estructuras celulares y el estiramiento de las capas epiteliales que constituyen el folículo (Wallace y Selman, 1981)

**Oscuros:** Días del calendario lunar correspondientes a la luna nueva.

**Perinucleolar:** Etapa del estadio de crecimiento del oocito caracterizado por ser células pequeñas con afinidad tintorial basófila intensa en el citoplasma y de menor intensidad en el núcleo. En la etapa inicial se observan nucléolos esféricos en el núcleo; al avanzar el desarrollo los nucléolos disminuyen su tamaño y se disponen cerca de la membrana nuclear (Walace y Selman, 1981)

**Potencial reproductivo:** Véase fecundidad

**Previtelogénicos:** Oocitos con esferas en la periferia del ooplasma en donde se inicia la acumulación de vitelo, dando inicio el proceso de crecimiento del oocito, a través de la secuenciación de vitelogenina proveniente de un precursor hepático (Walace y Selman, 1981).

**Precisión:** Término que se encuentra estrechamente relacionado con la varianza encontrada en las estimaciones. Cuanto menor sea la varianza mayor será la precisión (Begega *et al.*, 2000)

**Proliferación:** Estadio caracterizado por la división mitótica de las gonias; posteriormente diferenciadas en oogonias y espermatogonias (Walace y Selman, 1981)

**Proteólisis:** Etapa del estadio de madurez final del oocito caracterizado por la lisis de los glóbulos de vitelo proteico, paso previo a la hidratación (Walace y Selman, 1981).

**Reclutamiento:** De manera general es la incorporación de organismos a un proceso (Bakun, 1985).

**Reclutamiento pesquero:** Cantidad de peces jóvenes que sobreviven desde los estadios de: huevo, larva y juvenil hasta alcanzar el tamaño en el que son susceptibles de ser capturados por las artes de pesca, y son registrados por la pesquería (Bakun, 1985).

**Temporalidad del desove:** Es la regulación que se observa entre los factores internos que controlan la madurez y el desove como una respuesta bien regulada por factores exógenos específicos, sujetos a la época del año y la ubicación geográfica (Stacey, 1984).

**Vitelogénesis:** Es el periodo en el desarrollo del ovario, en el que las proteínas extraováricas son aisladas, procesadas y empaçadas dentro de los oocitos en forma de esferas o glóbulos. La vitelogénesis es el principal evento, responsable del crecimiento de los oocitos en muchos teleósteos (Tyler y Sumpter, 1996).

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Plano dividido en rectas paralelas para lanzar una aguja al azar propuesto por Buffon.	7
<b>Figura 2.</b> Plano de probabilidades de Laplace.	8
<b>Figura 3.</b> Mapa de ubicación geográfica de Bahía Magdalena.	14
<b>Figura 4.</b> Esquema que muestra el procedimiento para el cálculo del porcentaje de encogimiento del tejido.	18
<b>Figura 5.</b> Imagen del portaobjetos escaneado, en donde <b>a, b, c</b> son los tres niveles de corte.	19
<b>Figura 6.</b> Plantilla con los cuadrantes de muestreo aleatorio sistemático.	20
<b>Figura 7.</b> Las dos imágenes que conforman el disector. Primera imagen (a), correspondiente al primer corte y a 250 $\mu\text{m}$ de distancia el segundo corte (b).	21
<b>Figura 8.</b> Amplificación del cuadrante inferior delimitando los oocitos.	22
<b>Figura 9.</b> Imágenes con el fondo invertido para resaltar los contornos.	22
<b>Figura 10.</b> Registro al azar del diámetro de los oocitos próximos al desove a los que se les observa el núcleo (a). Conteo de los oocitos para la estimación de la fecundidad (b).	24

- 
- Figura 11.** Distribución de talla de la sardina monterrey recolectada de enero a marzo del 2006 en Bahía Magdalena, B.C.S. 29
- Figura 12.** Proporción de los estadios de madurez observados durante la Temporada de reproducción 2006 en Bahía Magdalena. 30
- Figura 13.** Imágenes al microscopio de las cuatro etapas del estadio de madurez, a) Vitelogénesis final con las células de la capa granulosa altas, b) Proteólisis inicial (inicia la integración de la gota de aceite c) Núcleo migratorio y d) hidratación inicial (inicia la fusión de los gránulos de vitelo. 31
- Figura 14.** Distribución de frecuencias de las etapas del estadio de madurez en las que se encontraban las muestras seleccionadas para la estimación de la fecundidad parcial. 32
- Figura 15.** Diagramas de dispersión de la fecundidad parcial individual de la sardina monterrey para la temporada de reproducción 2006 en Bahía Magdalena. 33
- Figura 16.** Valores promedio, desviación estándar, máximos y mínimos de la fecundidad parcial por etapa del estadio de madurez. 34
- Figura 17.** Prueba de Kolomogorov-Smirnov para el análisis de bondad en el ajuste a la distribución normal de los datos de fecundidad estimados con el método gravimétrico. 35

- 
- Figura 18.** Prueba de Kolomogorov-Smirnov para el análisis de bondad en el ajuste a la distribución normal de los datos de fecundidad estimados con el método estereológico. 37
- Figura 19.** Comparación de los valores promedio, desviación estándar, máximos y mínimos de las estimaciones de fecundidad parcial obtenida con ambos métodos. 38
- Figura 20.** Gráfica de dispersión de los valores promedio de fecundidad parcial en el análisis de regresión con ambas metodologías. 39
- Figura 21.** Valores de fecundidad parcial de la sardina monterrey estimadas por estereología, con respecto a la talla. 40
- Figura 22.** Dispersión de los datos y línea de regresión de la fecundidad Parcial y el peso libre de ovario, utilizando el modelo potencial. 42

## Lista de tablas

<b>Tabla I.</b>	Clasificación de los estadios y las etapas de estos en el ciclo reproductivo antes de la puesta.	16
<b>Tabla II.</b>	Proporciones de los estadios de madurez en el ovario de <i>Sardinops sagax</i> de enero a marzo de 2006 en Bahía Magdalena, B.C.S.	30
<b>Tabla III.</b>	Proporción de las etapas del estadio de madurez en la muestra, por mes y en general.	32
<b>Tabla IV.</b>	Valores de la fecundidad parcial individual de <i>Sardinops sagax</i> obtenidas por el método gravimétrico para la temporada de reproducción 2006, en Bahía Magdalena, B.C.S.	32
<b>Tabla V.</b>	Niveles de significancia de las comparaciones pareadas en el análisis de variancia de la fecundidad parcial.	34
<b>Tabla VI.</b>	Resultados de la prueba de t pareada para el ejercicio de área mínima del corte para hacer la estimación de fecundidad parcial.	36
<b>Tabla VII.</b>	Medidas tomadas del tejido antes y después del proceso histológico. a) Largo, b) ancho y c) alto, Ce= corrección de encogimiento.	36
<b>Tabla VIII.</b>	Valores de fecundidad parcial por mes obtenidos a través del método estereológico.	37
<b>Tabla IX.</b>	Datos de las seis muestras eliminadas del análisis, que se encontraban en la etapa de hidratación inicial.	38
<b>Tabla X.</b>	Resumen de resultados del análisis de variancia de la fecundidad parcial estimada con ambos métodos.	39
<b>Tabla XI.</b>	Cálculos del coeficiente de error y el error estándar para los valores de fecundidad parcial por rango de talla, estimados con estereología.	41

<b>Tabla XII.</b> Datos promedio de las estimaciones de fecundidad parcial individual de <i>Sardinops sagax</i> por lance de pesca, aplicando el método gravimétrico y estereológico.	42
---	----



## Resumen

Para el monitoreo y la estimación de biomasa de la población de sardina Monterrey, uno de los modelos que se utiliza está basado en la estimación de las tasas de producción de huevos, en donde interviene la fecundidad, la cual es estimada a través del método gravimétrico, proceso minucioso en el que se invierte una gran cantidad de tiempo. Se han hecho algunas estimaciones de fecundidad en peces directamente de las imágenes de preparaciones histológicas de ovarios maduros utilizando métodos estereológicos. Para el presente trabajo se recolectaron 821 organismos a bordo de los barcos sardineros que operan en Bahía Magdalena de enero a marzo de 2006. Se obtuvieron los datos morfométricos y se realizaron cortes histológicos de los ovarios. Se seleccionaron 205 hembras en la etapa más avanzada de madurez para la estimación de la fecundidad parcial utilizándose los métodos gravimétrico y estereológico. En este último se aplicaron ajustes al método del disector físico como unidad de volumen para estimar la densidad numérica, directamente con tres cortes histológicos de cada ovario separados por distancias conocidas. Los conteos estuvieron integrados por los oocitos en los que se distinguiera el núcleo. El método gravimétrico se aplicó con el proceso regular de conteo de la moda más avanzada con el tejido en fresco. Al comparar los resultados obtenidos de fecundidad parcial con ambas metodologías, no se encuentran diferencias significativas ( $p > 0.53$ ) con el análisis de variancia, así como el análisis de regresión demuestra la predictibilidad de una metodología sobre la otra ( $r = 0.98$ ). La estacionalidad de la reproducción y los valores de fecundidad parcial coinciden con lo anteriormente encontrado para la zona. Con los resultados obtenidos se recomienda ampliamente la utilización de la estereología para la estimación de la fecundidad parcial de la sardina. Los resultados son totalmente confiables, así como la posibilidad real de reducir los tiempos de procesamiento. La aplicación de métodos estereológicos abre la posibilidad de estudios más detallados de la dinámica del ovario en esta y otras especies, ampliándose el alcance morfológico y fisiológico al que se puede acceder con la histología y la histoquímica.

## Abstract

Monitoring of biomass and population of the Monterrey sardine is commonly based on estimates of egg production method, using the gravimetric method, to estimate fecundity which is very time consuming. In some instances, fecundity of fish species has been estimated using stereological methods on mature ovaries. For this study, 821 specimens were collected from fishing boats in Bahía Magdalena from January to March of 2006. Morphological data were registered and histological sample of ovaries were prepared. Partial fecundity was estimated using 205 female specimens and the gravimetric and stereological methods. The disector of the stereological method was adjusted to estimate numerical density using, for each ovary, three tissue slides at equivalent distances. Oocytes where the nucleus was evident were taken into account for analysis. For the gravimetric method the most advanced mode was used from fresh tissue samples. There was not a significant difference in the fecundity estimate between the stereological and gravimetric methods ( $P=0.53$ ), and a significant regression analysis between fecundity values estimated using both methods indicated high predictability. Seasonality in reproduction and partial fecundity values coincided with previous reports on the study area. From the results obtained in this investigation it can be concluded that the stereological method can be recommended for the estimation of partial fecundity in the sardine. The results obtained are reliable and the time used for sample processing can be greatly reduced. Moreover, the stereological methods can be used to study in detail the dynamics of ovarian development in the sardine and other species, thus widening the morphological and physiological analysis based on histological and histochemical methods.

## Introducción

El estudio de la biología reproductiva de las especies es uno de los aspectos de mayor importancia para profundizar en el conocimiento de la dinámica poblacional, sobre todo de aquellas especies que sostienen importantes pesquerías, como la de la sardina monterrey (*Sardinops sagax*). El esfuerzo reproductivo es una variable crítica debido a la dependencia frecuentemente demostrada del reclutamiento (el volumen de biomasa que se incorpora al stock susceptible a las artes de pesca) y el stock desovante, sobre todo en poblaciones que presentan importantes fluctuaciones en su abundancia. En este sentido el monitoreo y seguimiento de parámetros como la fecundidad, temporalidad del desove, frecuencia de puesta, la edad o la talla de primera reproducción, son variables que intervienen en la mayoría de los modelos de evaluación, desde diferentes puntos de vista.

En México la sardina es una de las pesquerías mas importantes, particularmente en el Noroeste del país, alcanzando hasta 193 mil ton de captura en 2005 (Conapesca, 2007).

La sardina es una especie pelágica, ovípara, con un desarrollo asincrónico en el crecimiento de los oocitos; es considerada como una especie iterópara. El patrón de reproducción presenta un ciclo anual y durante la temporada de puesta, de enero a marzo en el área de Bahía Magdalena (Torres-Villegas *et al.*, 1986), se presenta un ciclo diario, en el que se ve involucrado el desarrollo, crecimiento y maduración de los oocitos producidos en desoves múltiples durante la temporada de puesta (Torres-Villegas *et al.*, 1995; Perezgómez, 2004). *Sardinops sagax* habita aguas costeras templadas y subtropicales, asociadas a sistemas de corrientes de alta productividad como la Corriente de Humboldt en la costa oeste de América del Sur, la Corriente de California a lo largo de las costas de Canadá, Estados Unidos y México, la Corriente sur de Benguela al sur de África, en el Pacífico Nor-occidental a Corriente de Kuroshio y la corriente Australiana del Este (Grant y Lestie, 1996).

Uno de los modelos utilizados para la evaluación de la biomasa desovante, es el Modelo de Producción de Huevos, (MPH) y el Modelo de Producción diaria de Huevos, (MPDH) con diferentes propuestas de aplicación (Parker, 1980: Picquelle y Stauffer, 1985). Se trata de métodos de estimación instantánea de la biomasa desovante en donde intervienen la estimación de la producción diaria de huevos en el mar, la fecundidad parcial, la frecuencia de hembras desovantes, proporción sexual y peso promedio de las hembras para estimar el tamaño del stock. En estos modelos son aplicados parámetros biológicos de la población adulta y la abundancia de huevos en el mar, lo que le otorga un nivel de precisión alto (Santander *et al.*, 1984). La aplicación de estas metodologías ha permitido profundizar en el conocimiento de la biología reproductiva de los peces con desoves parciales, ya que es necesario conocer la temporalidad de la puesta, los tiempos de reabsorción de los folículos postovulatorios (Hunter y Goldberg, 1980), así como la estimación de la fecundidad parcial y la fecundidad diaria específica entre otros (Hunter y Lo, 1990).

La evaluación de la biomasa desovante obtenida por medio del MPDH ha recibido opiniones a favor y en contra, argumentándose lo costoso de las campañas, la necesidad de contar con un volumen considerable de muestras que permitan manejar niveles altos de confianza en las estimaciones y la variancia asociada de los cinco parámetros biológicos involucrados, invirtiéndose gran cantidad de tiempo al momento de generar la información (Alheit, 1993). Para obtener los parámetros reproductivos en el modelo, es necesario la manipulación de tejido en fresco para la aplicación de métodos histológicos, y la estimación de la fecundidad, ya que los resultados en las determinaciones del estado de madurez de los ovarios, son indiscutibles, observando características de la morfología celular que indican con exactitud los procesos previos y posteriores al desove, que sin lugar a dudas señalan el estado reproductivo (Hunter y Macewicz, 2003).

En la biología reproductiva de las especies la estimación de la fecundidad depende por completo de las tácticas y estrategias desarrolladas. Las especies de fecundación externa se caracterizan por altas tasas de producción de gametos, lo cual se ejemplifica con toda claridad en los peces pelágicos menores como la sardina. Esta producción elevada compensa altas tasas de mortalidad en los estadios de vida previos al reclutamiento que se relacionan con la variabilidad ambiental (Pitcher, 1995). Una de las estrategias es acumular reservas y emplearlas al momento de la reproducción, lo que le permitirá atenuar los efectos del ambiente (Radovich 1962, Munro, 1990, Crim y Glebe 1990). Como *Sardinops sagax* tiene una fecundidad **indeterminada**, con producción continua de oocitos y desoves parciales a lo largo de la temporada de puesta, el número de oocitos no se encuentra **determinado** al iniciar la temporada de reproducción (Hunter y Goldberg, 1980; Hunter y Macewicz, 1980). En principio, con estas condiciones sólo es posible estimar la fecundidad parcial, es decir, la fecundidad por desove parcial.

La primera estimación de fecundidad de la sardina del Pacífico que tomó en cuenta los desoves parciales fue hecha por MacGregor (1957) quien evaluó el grupo de oocitos de la moda más avanzada, a partir del análisis de la distribución de diámetros. Desde entonces a la fecha se desarrolló un método alternativo al método de la moda más avanzada que se basa en la contabilización de oocitos hidratados (Hunter y Goldberg, 1980; Hunter y Macewicz 1980). Hunter *et al.* (1985) reconocieron las dificultades que se presentan para obtener suficientes hembras hidratadas para estimar la fecundidad y, señalaron la alternativa de conteos de oocitos en etapa de núcleo migratorio, un paso previo a la hidratación. Con esta alternativa Hunter *et al.* (1992) estimaron la fecundidad parcial de *Microstomus pacificus*.

Recientemente se han tipificado las etapas previas a la hidratación en la anchoa europea (Ochoa-Baez, 1998) y para la sardina, Chavira-Niño (2005). Estas etapas se tipifican como: las células de la capa granulosa altas, la etapa en la que se forma la gota de aceite, el núcleo en migración al polo animal y la proteólisis del vitelo.

Siguiendo esta clasificación se han realizado estimaciones de fecundidad parcial con la sardina monterrey capturada en Bahía Magdalena, Golfo de California e Isla Cedros aplicando el método gravimétrico, en las variantes descritas anteriormente. (Torres-Villegas, 1986; Torres-Villegas *et al.*, 1997; Torres-Villegas *et al.*, 2000; Perezgómez, 2004; Estrada-Vargas, 2004 y Moguel-Hernandez, 2007).

Esta metodología consume una gran cantidad de tiempo dado que es necesario, una vez hecha la evaluación histológica y la selección de las muestras para la estimación de la fecundidad, trabajar nuevamente con el tejido en fresco, obtener tres submuestras de 0.05 g por cada ovario, disgregarlo y preparar la muestra alineando los oocitos para evitar errores en el conteo. Si se requiere hacer la estimación de fecundidad con muestras en las cuales el ovario no ha alcanzado el estado de hidratación, pero se encuentra en la etapa de la madurez final, es necesario determinar el grupo de oocitos a evaluar midiendo el diámetro para determinar la moda más avanzada que representa el próximo desove. (MacGregor, 1957; Hunter *et al.*, 1985; Torres-Villegas y Perezgómez, 1988). Se han aplicado otras metodologías para las estimaciones de fecundidad, como el método volumétrico, contadores automáticos de partículas y el denominado método auto-diametral de fecundidad, en el que a través de una automatización parcial, utilizando un analizador de imágenes se mide el diámetro de los oocitos en lugar de contarlos, con lo que se construye una curva de calibración (LeClaus, 1977; Emerson *et al.*, 1990; Thorsen y Kjesbu, 2001).

Una herramienta importante para los estudios biológicos es la histología, que puede abordarse desde un punto de vista meramente morfológico, estudiando los tejidos como patrones topográficos, extendiéndose a otras técnicas mas especializadas que son utilizadas para evaluar la distribución en el espacio de componentes químicos como la histoquímica, la inmunofluorescencia y elementos radioactivos (Shea, 1962). Actualmente es común encontrar trabajos con temas de pesquerías que incluyen en sus análisis la técnica histológica. En áreas del conocimiento relacionadas con los cultivos, los métodos histológicos resultan indispensables. Lo

anterior se debe a que la imagen histológica de un órgano, constituye una importante prueba del estado fisiológico en que se encuentran los organismos. En estas circunstancias el hecho de desarrollar métodos para establecer protocolos que permitan pasar de la descripción morfológica hacia la estimación de volúmenes, densidades numéricas, etc. de componentes de los tejidos, puede ser muy importante para profundizar en los análisis de la relación organismo – ambiente.

Son indiscutibles los avances y la aplicación de la estereología en la ciencias médicas, como la utilización de la tomografía computarizada y la resonancia magnética, cuyas bases son netamente estereológicas (Begega *et al.*, 2000), y mas concretamente la aplicación en la biología reproductiva (Christiansen *et al.*, 1973; Emerson *et al.*, 1990; Andersen, 2003).

La finalidad del presente trabajo es contrastar el método estereológico para estimar densidades numéricas utilizando las imágenes obtenidas de los cortes histológicos para la estimación de la fecundidad parcial de *Sardinops sagax*, buscando reducir los tiempos y costos en el procesamiento, sin perder precisión en los resultados, mismos que serán validados con aquellos obtenidos con el método gravimétrico, utilizando las mismas muestras con ambas metodologías.

## Antecedentes

En los últimos años una buena parte del desarrollo de las ciencias médico-biológicas se han visto reforzadas por el uso, cada vez más frecuente, de estudios a nivel celular desde el punto de vista morfológico y fisiológico. La histología y la microscopía han jugado un papel histórico fundamental para el avance de estas ciencias, sobre todo han sido el pilar de aquellos estudios de tipo descriptivo, en los que únicamente se estudiaban los patrones celulares en los tejidos analizando la posición, las relaciones y las dependencias de las partes en un tejido utilizando escalas nominales, ordinales o porcentuales (Shea, 1962). Actualmente se han desarrollado y aplicado herramientas como la morfometría, la estereología y el análisis digital de imágenes, mismas que conforman la tecnología de punta dada la necesidad de contar con estimaciones certeras en número, forma y volumen a nivel celular (Begega *et al.*, 2000).

La estereología es considerada como un grupo de herramientas con una base matemática bien definida para la exploración del espacio tridimensional a partir cortes bidimensionales o de proyecciones sobre el plano. Consiste en la extrapolación del plano al espacio, con lo que se obtiene una estimación de volumen, área, longitud o número de partículas contenidas en una matriz (Weibel, 1979).

Esta disciplina tiene sus orígenes en la teoría de las probabilidades geométricas desarrollada por Pierre Simon Laplace en 1812, aunque vinculada inicialmente a los juegos de azar, dando lugar a la estocástica contemporánea, de gran interés para la matemática pura y aplicada (Stoyan *et al.*, 1987). Uno de los primeros planteamientos de la teoría de las probabilidades geométricas fue propuesto por George Louis Leclerc (Conde de Buffon) con el ensayo conocido como “El problema de la aguja de Buffon” en el que considera un plano dividido por rectas paralelas a una distancia  $d$ . Sobre el plano se lanza una aguja de longitud  $l$  no



mayor que  $d$ . La constante 2 proviene de la integración del ángulo  $\Theta$  en la inclinación de la aguja (Fig.1).

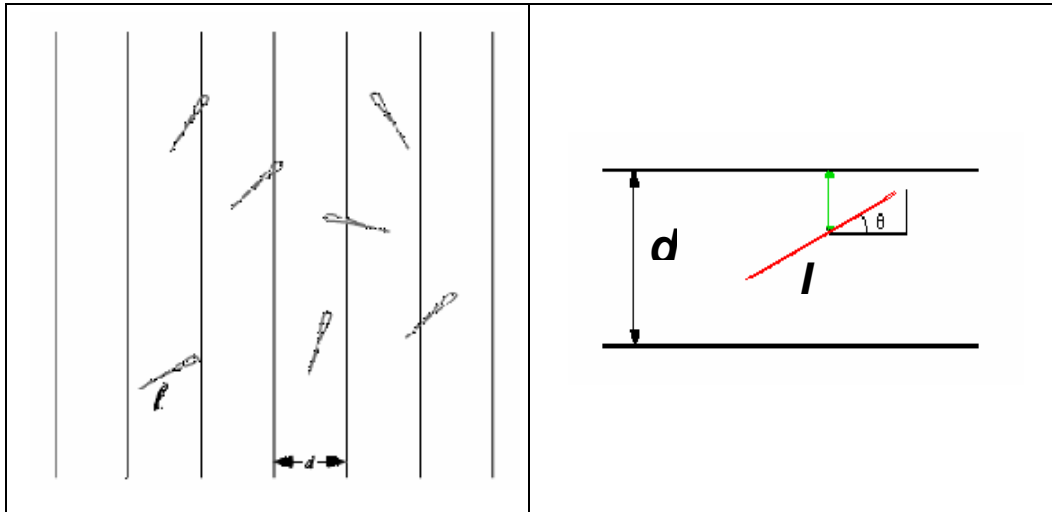


Figura 1. Plano dividido en rectas paralelas para lanzar una aguja al azar, propuesto por Buffón.

Puede ser que la aguja corte alguna de las rectas paralelas o que no corte ninguna. La probabilidad de que alguna recta paralela sea cortada por la aguja es:

$$p = \frac{2}{\pi} * \frac{l}{d}$$

Se trata de un juego de azar cuya solución consiste en “medir” los casos favorables y posibles en lugar de “contarlos”, como ocurre en el caso de los juegos discretos de cartas o de dados. La diferencia entre “medir” y “contar” es lo que distingue a la geometría de la aritmética. En sí, el principio de Buffon no se relaciona de manera muy directa con la estereología pero tiene elementos conceptuales que fueron retomados después, como un objeto estructural caracterizado por su dimensión (la aguja) y que ésta se encuentra relacionada con un sistema de referencia geométrico (la rejilla). Ambas se encuentran cuantitativamente definidas con una interacción azarosa que ocurre con una probabilidad predecible, lo que caracteriza a todos los principios estereológicos (Weibel, 1979).

Pierre Simon Laplace en su *Teoría analítica de las probabilidades*, toma el “plano de la aguja de Buffon” y lo divide en rectángulos de lados  $d_1$  y  $d_2$ . Se tira una aguja de longitud  $a$  no mayor que los rectángulos del plano (Fig. 3).

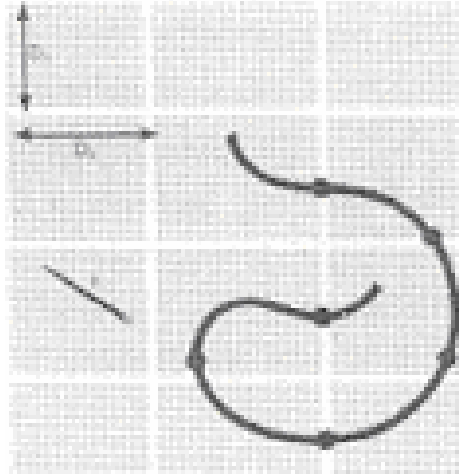


Figura 3. Plano de probabilidades de Laplace.

Entonces la probabilidad de que la aguja corte alguno de los lados de la red de rectángulos es:

$$p = \frac{(2a(d_1 + d_2) - a^2)}{\pi} d_1 d_2$$

Si en lugar de la aguja de longitud  $a$  fuera lanzada al azar sobre el plano una curva de longitud  $l$  y de forma cualquiera, la esperanza matemática o el valor medio del número  $N$  de puntos en que la curva corta los lados de la red de rectángulos será:

$$E(N) = \frac{2l(d_1 + d_2)}{\pi} d_1 d_2$$

Estas fórmulas pasaron a ser frecuentemente aplicadas para medir longitudes sobre preparaciones microscópicas colocando un reticulado rectangular en donde se cuenta el número de veces que los lados del reticulado o las paralelas cortan al objeto sujeto a medición. (Santaló, 1989)

Los primeros modelos abordados por la estereología como tal, fueron desarrollados por el geólogo francés Delesse (1847) que lo aplicó para determinar la composición de las rocas, y muchos años después fue perfeccionado por Glagolev (1934), el cual se basa en las proporciones relativas de superficie y volumen posibilitando el análisis morfométrico de diversas estructuras permitiendo establecer la organización espacial de sistemas tridimensionales y determinar las relaciones cuantitativas como fracciones de volumen, relaciones superficie volumen, densidad y número de partículas (Christiansen *et al.*, 1973). De los primeros trabajos que aplican la estereología a las ciencias medico-biológicas, son: el de Wicksell en 1925, que analiza el problema de los conteos de corpúsculos en cortes histológicos y el de Harold Chalkley en 1943 el Instituto Nacional de Cáncer en Bethesda (citados en Weibel, 1979).

Actualmente la estereología se aplica principalmente en las biociencias, proponiendo diferentes procedimientos dependiendo del tipo de estructura a analizar, tales como, longitudes glomerulares y otras como la densidad numérica de diferentes grupos celulares en un mismo tejido, como por ejemplo en el estudio de la dinámica del crecimiento celular en los ovarios de *Tilapia zillii* (Coward y Bromage, 1998).

Las partículas o las células existen en una matriz tridimensional; entonces, para poder resolver este objetivo es necesario considerar la profundidad en el corte histológico. Con esto se asegura que los cálculos se realizan en un ambiente tridimensional logrando con esto, establecer el número de células por unidad de volumen. Esta metodología es denominada “El principio del disector” (Jensen y Gundersen, 1983; Stereo, 1984). Se considera un disector físico a dos cortes consecutivos del tejido, separados por un espesor de distancia conocida. Esta distancia no debe de ser mayor al tamaño de la célula más pequeña que será incluida en los conteos. Este espesor generalmente se establece en  $1/4$  o  $1/3$  del tamaño de la célula, ambas imágenes se comparan y sólo forman parte del conteo las células que no aparecen repetidas, evitando con esto la sobrestimación. El

número de células por unidad de volumen es estimado y extrapolando a la totalidad del volumen del órgano en estudio (Howard y Reed, 1998; Andersen, 2003).

Para las estimaciones de fecundidad utilizando la estereología, se han aplicado variantes del modelo general propuesto por Weibel y Gomez (1962). Chistiansen y colaboradores (1973), realizan la estimación de la fecundidad de *Chlamys tehuelcha*. Uno de los primeros trabajos en que estiman la fecundidad en peces utilizando la estereometría es el de Emerson y colaboradores (1990), en el que evalúan la fecundidad de *Engraulis mordax* y *Scomber japonicus*, comparando los resultados obtenidos y al aplicar tres diferentes métodos: estereología, un contador de partículas y un método volumétrico. Greer y colaboradores (1994), hacen la estimación de la fecundidad de *Scomber scombrus* aplicando la estereología tratando de observar si la fecundidad de esta especie se encuentra determinada. Coward y Bromage (1998), utilizando estereología encuentran, que la fracción volumétrica de los oocitos previtelogénicos es constante a lo largo de la temporada de reproducción, en un estudio en el que tipifican la dinámica del ovario de *Tilapia zillii*. Con el lenguado (*Solea solea*), Withames (2003) realizó estudios para estimar la fecundidad potencial evaluando cada grupo de oocitos intraováricos y la intensidad del desove evaluando los oocitos hidratados, los folículos post-ovulatorios y las atresias. Thorsen y colaboradores (2006) analizan diferentes modelos para la estimación de la fecundidad potencial del bacalao del Ártico, *Gadus morhua*, haciendo una recopilación de datos, para los que en algunos años, las estimaciones de fecundidad, estimación del proceso de atresia e intensidad de la misma, fueron obtenidas aplicando métodos estereológicos. Medina y colaboradores (2002), analizaron el estatus reproductivo del atún aleta azul (*Thunnus thynnus*), en temporada de reproducción y en el momento de la migración, evaluando los grupos de oocitos y la fecundidad utilizando métodos estereológicos.

Como una perspectiva general sobre la fecundidad en los peces iteróparos, se puede decir que ésta presenta grandes variaciones, inclusive dentro de una misma

temporada de reproducción. Existen trabajos que analizan esta variabilidad; en los lenguados con *Pleuronectes plateas*, Simpson (1951) y en *Hippoglossoides platessoides*, Bagenal (1957; 1966) observaron una variación anual en las estimaciones de fecundidad. El estudio realizado por Beacham y Murray (1993) con salmones, correlacionó el tamaño de los oocitos, la talla de los peces, inclusive la latitud, en la distribución de los peces, con lo que aparentemente, encuentran valores de fecundidad más altos a menores latitudes. En cuanto a los clupeidos, se ha documentado una alta variación, ya sea dentro de la temporada de reproducción, como entre los años (Hunter y Goldberbg, 1980; Hunter y Macewicz, 1980; Torres-Villegas y Perezgómez, 1988, Torres-Villegas, 1997; Plaza *et al.*, 2002; Perezgómez, 2004). Una probable explicación a esta variabilidad biológica se asocia con la energética del desove en *Engraulis mordax*, en donde se señala que la variación en los valores de fecundidad parcial que se observa en hembras de la misma talla o peso puede ser causada por variaciones en el tamaño de los huevos, la disponibilidad de alimento y el número de desoves previos en la temporada de puesta para una misma hembra (Hunter y Leong, 1981). Es importante señalar que no debe de perderse de vista esta variabilidad biológica natural al momento de obtener los coeficientes de variación (CV) y los coeficientes de error (CE) en las metodologías aplicadas.

## Justificación

En el seguimiento que se ha establecido de la pesquería de sardina en la costa occidental de la península de Baja California, se ha empleado el MPDH. Este método tienen una serie de ventajas, especialmente relativas a la precisión de las estimaciones (Parker, 1980). Sin embargo, se ha discutido la imposibilidad de usarlo, argumentando los elevados costos y el largo tiempo de procesamiento requeridos para su aplicación, particularmente para la estimación de la fecundidad parcial.

Ello justifica la búsqueda de alternativas, como los métodos estereológicos, que permitan reducir tiempos de procesamiento y los costos asociados, sin detrimento de la precisión en las estimaciones.

Además, los métodos estereológicos permiten estimar las fracciones volumétricas y densidades numéricas de diferentes tipos celulares, y abren la posibilidad de evaluar otras estructuras contenidas en el ovario que sólo es posible tipificarlas en imágenes al microscopio. Para estudios de numerosas pesquerías y de cultivos de peces, es importante contar con herramientas que permitan cuantificar componentes a nivel celular en tejidos o en órganos, con el fin de asociarlo al estado fisiológico de los organismos.

Por otro lado, las observaciones morfológicas, apoyadas con criterios numéricos de los componentes tisulares o celulares permiten, por una parte, relacionar la fisiología con la morfología microscópica. La aplicación de métodos estereológicos permitirá explorar más en la fisiología de los organismos y relacionar algunas características de su dinámica poblacional.

## HIPÓTESIS

Las estimaciones de fecundidad parcial obtenidas con el método estereológico, no presentan diferencias con las obtenidas con el método gravimétrico.

## Objetivos

### Objetivo general

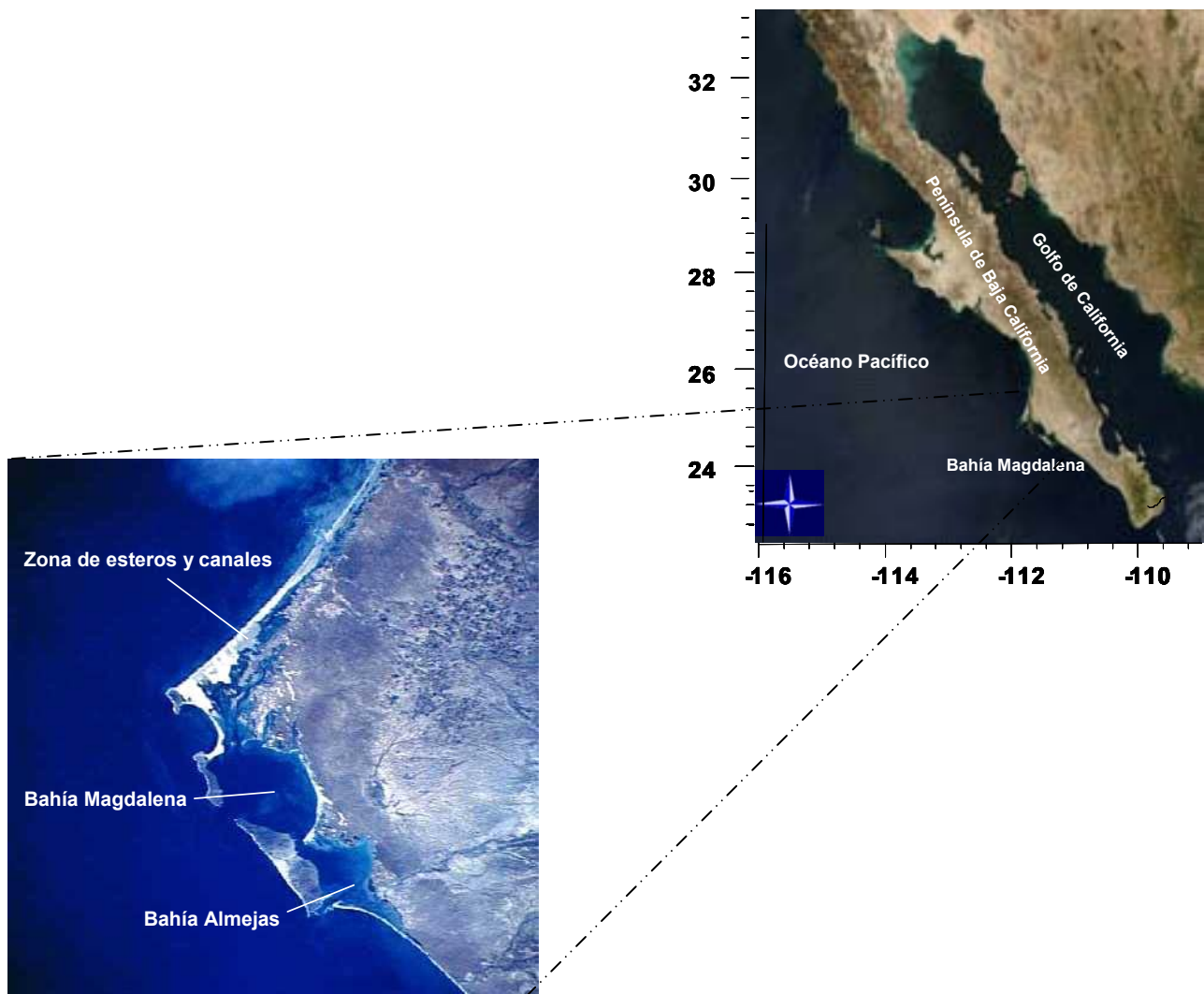
Evaluar la efectividad (eficiencia y confiabilidad) de la estimación de la fecundidad parcial de la sardina Monterrey *Sardinops sagax*, mediante métodos estereológicos con respecto al método gravimétrico convencional.

### Objetivos particulares

1. Estimar la fecundidad parcial de la sardina Monterrey mediante el método gravimétrico convencional.
2. Aplicar el análisis de imágenes en cortes histológicos para la aplicación del método estereológico
3. Estimar la fecundidad parcial mediante un método estereológico utilizándose las mismas muestras del método gravimétrico.
4. Medir el grado de precisión de los resultados obtenidos con la aplicación del método estereológico.
5. Comparar y evaluar las estimaciones con ambas metodologías.
6. Con los resultados obtenidos, estimar el valor de la fecundidad parcial promedio y fecundidad parcial relativa a nivel poblacional de *Sardinops sagax* en la temporada 2006 en Bahía Magdalena, B.C.S.

## Área de estudio

Bahía Magdalena es un cuerpo lagunar costero que se encuentra en la costa Occidental del estado de Baja California Sur, entre los 24° 15' y 25° 20' Latitud Norte y los 111° 30' y 112° 12' Longitud Oeste. Este complejo lagunar esta formado por dos cuerpos de agua y un sistema de canales y esteros. Bahía Magdalena, con una superficie de 882.7 km<sup>2</sup>, Bahía Almejas con una superficie de 370 km<sup>2</sup>. Hacia el Norte de Bahía Magdalena se ubica el sistema de esteros y canales con una superficie de 137 km<sup>2</sup> (Alvarez-Borrego *et al.*, 1975).





## Material y Métodos

Se procesaron los muestreos correspondientes a la temporada de puesta 2006 de la sardina Monterrey en Bahía Magdalena, B.C.S., mismos que forman parte del monitoreo permanente que se mantiene en la zona. Dichos muestreos se realizaron a bordo de la flota comercial que opera en Bahía Magdalena por personal de apoyo del Laboratorio de Morfofisiología, del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, durante los oscuros de enero a marzo de 2006. Se recolectaron un total de 821 organismos. Siguiendo los procedimientos descritos en el Instructivo PROMA (Programa de Muestreadotes Abordo), para la recolecta y fijación de las muestras (Torres-Villegas *et al.*, 2002), los ejemplares se obtuvieron en el momento de la descarga a la bodega del barco en el sitio de pesca; (70 ejemplares por lance de pesca). A los peces se les realizó una incisión sobre la línea media del cuerpo desde el ano, hasta la región gular, y dos cortes laterales posteriores a las aletas pectorales, con el fin de garantizar la correcta fijación del tejido gonádico. Se colocaron en una cubeta agregándoles inmediatamente formol al 10% en solución reguladora de fosfatos, (pH = 7.0). Las muestras se trasladaron al laboratorio y una vez ahí se renovó la solución fijadora para asegurar la preservación de las muestras.

Se obtuvieron los datos de Longitud Patrón, (a precisión 1.0 mm), el Peso total (a precisión 0.01g) y el Peso de la gónada (a precisión 0.01g).

Se tomaron submuestras de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> de la región media de uno de los lóbulos del ovario a las que se les aplicó la técnica histológica con cortes por parafina de 3 – 5 µm de espesor. Los cortes se colorearon de forma alternada con las siguientes técnicas: Hematoxilina-Eosína, Tricromica de Mallory, Azul alciano y Van Geason (Martoja y Martoja, 1970). Los cortes se montaron utilizando cytoseal. El análisis histológico se hizo con base en los criterios de Wallace y Selman (1981) quienes establecen tres estadios de madurez (tabla I). Las etapas que se incluyen en cada estadio fueron propuestas por Ochoa-Báez (1998) para la *Engraulis*

*encrasicolus* y, fueron adaptadas a la sardina monterrey por Torres-Villegas et al. 2000 (Tabla I).

Tabla I. Clasificación de los estadios y sus etapas que constituyen el ciclo reproductivo antes de la puesta de acuerdo con Wallace y Selman (1981).

Estadio	Etapas
Proliferación	Perinucleolares (iniciales y finales)
Crecimiento	Alvéolo cortical Inclusiones lipídicas Vitelogénesis (inicial, intermedia y final)
Madurez final	Celulas granulosa altas Proteólisis (formación de la gota de aceite) Núcleo migratorio Hidratación

Con los resultados del análisis histológico se seleccionaron las hembras para la estimación de la fecundidad, eligiendo los ovarios que se encontraran en el estadio de madurez final del oocito. Como criterios adicionales se descartaron aquellos ovarios que presentaron folículos postovulatorios y/o atrésicos, en cualquier etapa, así como, de acuerdo con los criterios de Hunter y Goldberg (1980), Hunter y Macewicz (1980) y Hunter et al. (1985). El resultado de esta selección fueron 211 sardinas que se emplearon para estimar la fecundidad parcial por los dos métodos propuestos.

Para las estimaciones de fecundidad parcial por el método gravimétrico, se tomaron muestras de 0.05 g de la parte central de uno de los lóbulos del ovario. Las muestras se tomaron por triplicado utilizando una balanza analítica. Se colocaron en portaobjetos con una gota de glicerina para disgregar la muestra y evitar la desecación (MacGregor, 1957; Leclus, 1977). Mediante un estereomicroscopio, se identificaron los oocitos de la moda más avanzada próximos al desove, los cuales corresponden con las etapas del estadio de madurez final antes mencionadas. Se realizaron los conteos de dichos oocitos y se extrapolaron al peso total del ovario,

obteniendo la fecundidad parcial individual promedio y la desviación estándar para cada ovario.

$$F_P = \frac{P_{Gj} \cdot N_{oi}}{P_{Mi}}$$

En donde:

$F_P$  = Fecundidad Parcial Individual

$P_{Gj}$  = Peso de la gónada

$N_{oi}$  = Número de oocitos en la muestra

$P_{Mi}$  = Peso de la muestra

$i$  = iesima muestra

$j$  = del individuo j

Se realizó un análisis de variancia de una vía de la fecundidad parcial para probar si existían diferencias significativas entre los valores de fecundidad estimada en las diferentes etapas de la madurez final del oocito, con el fin de considerar a las muestras que provienen de diferentes etapas como un solo tamaño de muestra.

Para estimar la densidad numérica de los oocitos próximos al desove por el método estereológico, primeramente se siguió la metodología que considera al disector físico como unidad de muestreo propuesta por diferentes autores (Stereo, 1982; Gudersen, 1986; Cruz-Orvide, 2004) El disector físico consta de dos cortes histológicos en donde la distancia entre ellos será de 1/4 o 1/3 del diámetro de las células a contar. Se comparan ambas imágenes y se cuentan los oocitos que no aparecen repetidos en ambos cortes (Howard y Reed, 1998; Andersen 2003). De acuerdo con este principio se diseñó el muestreo, se hicieron nuevamente cortes histológicos de los ovarios seleccionados para la estimación de la fecundidad y obtener los disectores. Se obtuvieron tres cortes del mismo ovario a diferentes distancias. Esta distancia estuvo determinada por el grado de madurez de cada ovario, ya que el diámetro de los oocitos próximos al desove se incrementa en la medida en la que se acerca el desove, modificado con esto la profundidad del disector. Los ovarios cuya etapa de madurez estaba indicada por la presencia de

oocitos con células columnares en la capa granulosa, la profundidad del disector fue de 150  $\mu\text{m}$  entre cada corte, ya que el diámetro de estos oocitos se ubicó alrededor de 500  $\mu\text{m}$ . Los ovarios que se ubicaron con oocitos en proteólisis (integración de la gota de aceite) la separación fue de 200  $\mu\text{m}$ , el diámetro de estos oocitos fue de 600  $\mu\text{m}$ . Los cortes de ovarios con oocitos en etapa de núcleo migratorio tuvieron una separación 250  $\mu\text{m}$  y finalmente aquellas que presentaron inicios de hidratación o hidratación avanzada, la separación de corte a corte fue de 300  $\mu\text{m}$ . Cabe mencionar que las muestras que fueron agrupadas en la categoría de hidratación inicial presentaban los primeros signos del proceso de proteólisis del vitelo, lo que caracteriza a la etapa de hidratación del oocito.

La temperatura recomendada para el baño de flotación para extender los cortes y montarlos, normalmente se ubica en los 40 °C (Aguilar-Morales *et al.*, 1996); se redujo a 35 °C para asegurar que los cortes se extiendan sin perder la integridad y evitar deformaciones o encogimientos (Petersen, *et al.*, 2001). Los cortes se colorearon con las técnicas anteriormente mencionadas.

Se hizo un ejercicio para determinar el factor de encogimiento del tejido, una vez que este ha pasado por todo el proceso histológico y con él corregir el volumen de la unidad de muestreo (Howard y Reed, 1998; Dorph-Petersen *et al.*, 2000). Se selecciono un ovario por cada etapa del estadio de madurez final. Se cortó la muestra de forma cuadrangular para facilitar el registro de las dimensiones antes y después del proceso histológico. Las dimensiones fueron las que se observan en la figura 4.

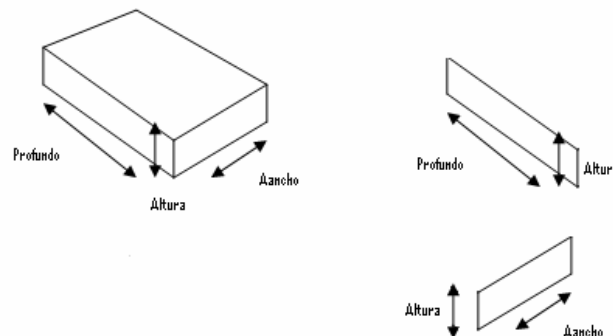


Figura 4. Esquema de corte y medición para el cálculo del porcentaje de encogimiento del tejido.

Se obtuvo el volumen inicial, antes de practicar el corte y el volumen final una vez que el corte había sido montado en el portaobjetos. El factor fue calculado como sigue:

$$Ce = \frac{Va - Vp}{Va}$$

en donde:

$Ce$  = Corrección de encogimiento

$Va$  = Volumen de la pieza antes del proceso histológico

$Vp$  = Volumen una vez procesado el tejido

El factor de corrección que se aplica es  $1 - Ce$  el cual se aplica al volumen de referencia.

Se digitalizaron las laminillas completas utilizando un Scanner modelo HP Deskjet F4100 con una resolución de 4800 pixeles por pulgada cuadrada, para tener en una sola imagen la totalidad del corte (Fig. 5). Asimismo se digitalizó la reglilla micrométrica bajo los mismos parámetros que los cortes histológicos, con el objeto de calibrar las herramientas de medida del software y la ampliación de las imágenes. Las imágenes se separaron y procesaron digitalmente utilizando el programa Image-Pro Plus ver. 4.5.0.29 de Media Cybernetics. Las imágenes se procesaron con un acercamiento del 1600%; en donde la resolución de la imagen permitió observar claramente las características de las células objetivo. Utilizando las herramientas del programa se mejoró el contraste de las imágenes a través de la ecualización y contraste de los tonos para facilitar su proceso.

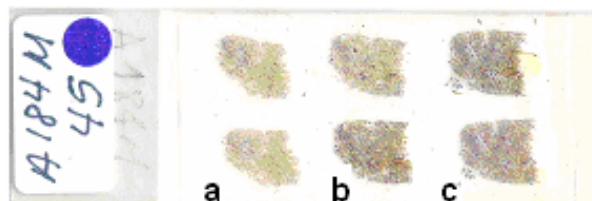


Figura 5. Imagen del portaobjetos escaneado, en donde **a**, **b**, **c** son los tres niveles de corte; dos cortes por nivel. Esta imagen corresponde a un ovario con Núcleo migratorio, entonces la distancia entre **a** y **b** son 250  $\mu\text{m}$  y entre **b** y **c** otras 250  $\mu\text{m}$ .

En la mayoría de los métodos que se aplican en estimaciones de densidad numérica (Emerson, 1990; Howard y Reed, 1998; Andersen, 2003) se sobrepone en la imagen una rejilla para realizar un muestreo aleatorio sistemático, conformada por áreas de muestreo o cuadrantes de 1.8 x 1.8 mm. Esta plantilla contiene 12 cuadrantes equidistantes. Con el fin de eliminar un sobre-muestreo en los conteos, se definieron como líneas de exclusión la izquierda y la inferior (línea continua), de manera que los oocitos que cruzan estas líneas no se consideran en el conteo. Mientras tanto, las líneas de inclusión son la derecha y superior (línea punteada) (Fig. 6).

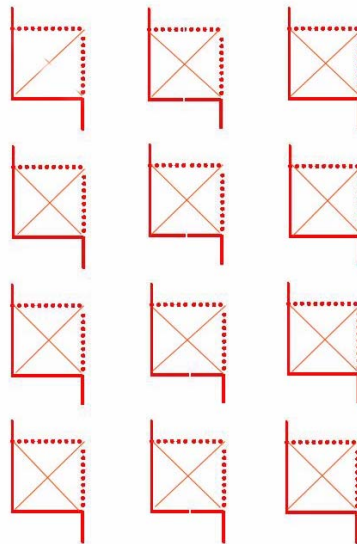


Figura 6. Plantilla con los cuadrantes de muestreo aleatorio sistemático

Ambas imágenes, la del tejido y la de la plantilla fueron sobrepuestas utilizando la aplicación de imagen sobrepuesta que ofrece el programa para proceso de imágenes Image-Pro Plus ver 4.5.0.29. La imagen de la plantilla se hace transparente con dicha herramienta y se sobrepone a la imagen del corte histológico. Se cuentan los oocitos que quedan dentro del área de muestreo (Fig.7).

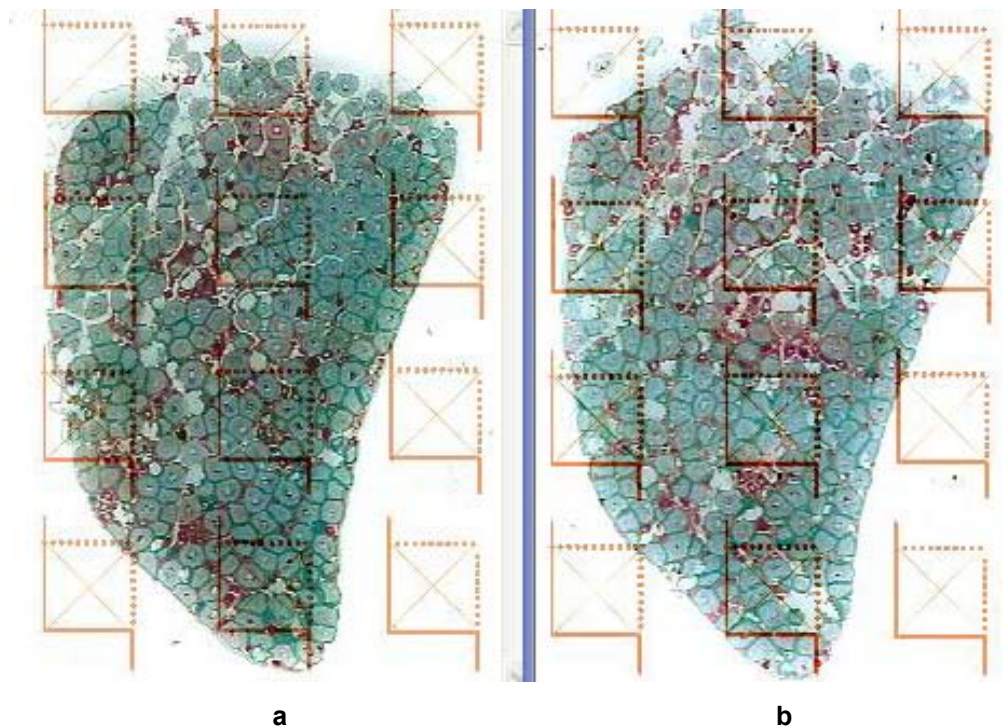


Figura 7. Primera imagen del disector (**a**), y 250  $\mu\text{m}$  de distancia el segundo corte (**b**).

Para comparar los cortes superior e inferior del disector y poder determinar los oocitos a contar se utilizaron los propios cuadrantes de conteo como marcos de referencia. Es decir, si el oocito ubicado en el ángulo superior derecho del cuadrante era el mismo que se ubicada en esa posición en el corte inferior del disector, para lo cual fue necesario resaltar los contornos mediante el proceso digital, debido a que la regularidad de la forma de los oocitos, y la densidad del tejido dificulta sobre manera discriminar a ojo, la presencia del mismo oocito en los dos cortes.

El siguiente paso consistió en identificar los oocitos que se encuentran en el corte *a* pero no en el *b*. A simple vista es muy difícil hacer esta comparación y discriminar que oocitos serán incluidos en el conteo. Para resolver esto se delimitaron los contornos de cada oocito para facilitar la comparación. (Fig. 8)

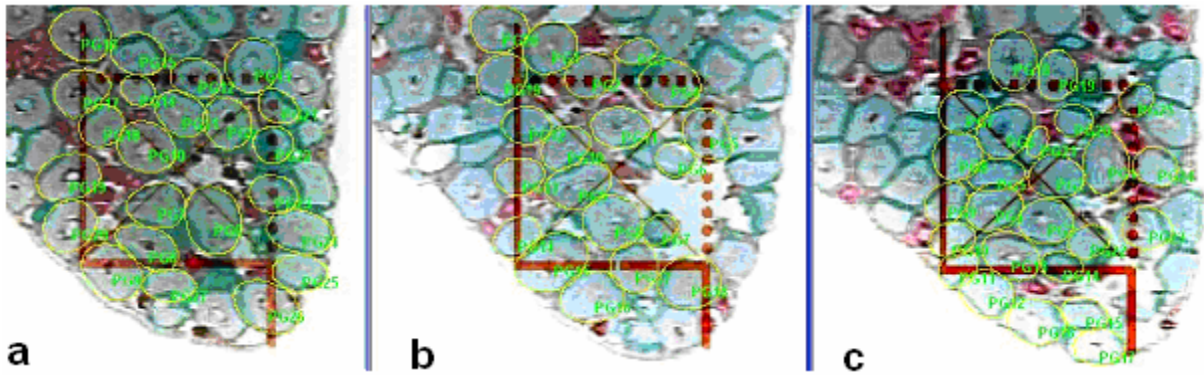


Figura 8. Amplificación del cuadrante inferior en los tres niveles de corte, **a**, **b** y **c**, resaltando los contornos de los oocitos.

Con el objeto de mejorar la identificación de los oocitos, la última etapa del procesamiento digital de la imagen consistió en obtener el negativo con lo que se obtuvo el fondo oscuro y el delineado de los oocitos en claro, y con esto observar el tamaño y la orientación de cada célula (Fig. 9)

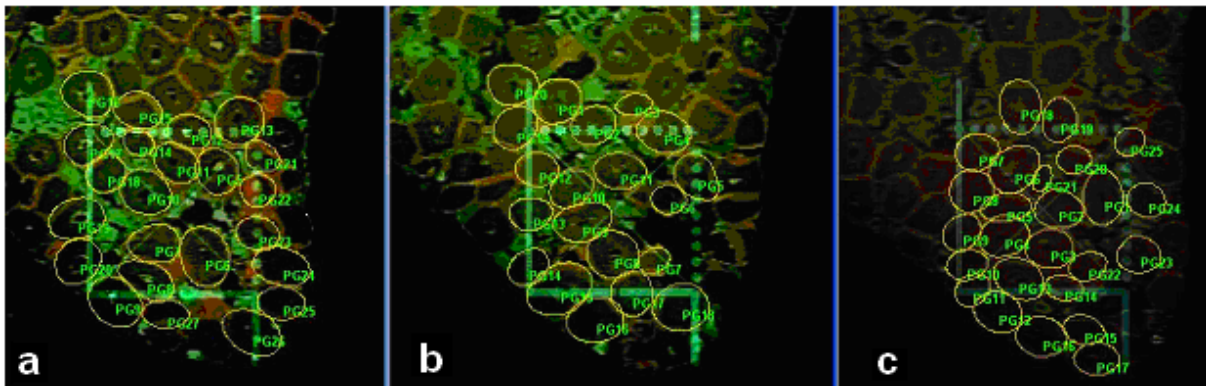


Figura 9. Imágenes con el fondo invertido para resaltar los contornos

Solo fue posible obtener una mejor discriminación comparando las imágenes mas lejanas, es decir, la a y la c, en donde la distancia entre ellas estaba cerca al valor del diámetro de los oocitos dándole el doble de profundidad al disector.

El número de células por unidad de volumen, que es el disector, es estimado con el siguiente modelo:



$$estN_v = \frac{1}{(a/f)(h)} * \frac{\sum_{i=1}^n Q}{\sum_{i=1}^n P}$$

en donde:

$estN_v$  = número de partículas por unidad de volumen.

$a/f$  = área por cuadrante contado en la superficie del corte.

$h$  = separación del corte (profundidad del disector)

$Q$  = número de células contadas en todos los cuadrantes del disector.

$P$  = número de cuadrantes muestreados en el disector.

Se realizó un ensayo aplicando esta metodología y se encontraron dificultades al comparar dos cortes contiguos derivadas de la densidad de oocitos en un ovario con madurez avanzada; puesto que identificar los oocitos que se encuentran en el los dos cortes y aquellos que inciden en solo un corte tiene alto grado de dificultad. A pesar del procesamiento de la imagen, de hecho el delineado de los oocitos fue el proceso que consumió mayor tiempo. Sin embargo, cuando se utilizó el tercer corte como imagen de referencia del primer corte para realizar los conteos, la diferenciación fue más evidente. Lo anterior se debe a que en el primer caso la diferencia entre los cortes a dos niveles de los oocitos no son lo suficientemente distintos como para notar claras diferencias. Al ampliar la distancia entre los cortes que se comparan, la diferencia del nivel de corte por célula se hace más amplia y más evidente.

Después de realizar los conteos, los resultados fueron sumamente inferiores a los obtenidos con el método gravimétrico (20,156 oocitos por hembra por el método gravimétrico y 2,187 por el estereológico). Se realizaron diferentes pruebas modificando la profundidad del disector hasta llegar al diámetro total de los oocitos próximos al desove. Los resultados no se modificaron sustancialmente. Se revisó con todo cuidado cada una de las partes del proceso, no encontrando errores en la aplicación y cálculos del modelo.

Dado el tamaño de los oocitos, la densidad y homogeneidad del tejido, se decidió aplicar un método estereológico alterno para estimar la densidad numérica. Con este método se eliminó el uso de la plantilla del muestreo sistemático, estimando la totalidad de la superficie del corte y asignándole la profundidad al corte con el diámetro de los oocitos. Esto último fue aplicado por Emerson *et al.*, (1990) pero utilizando la rejilla de Weibel.

El diámetro de los oocitos objetivo se estimó directamente de los cortes de oocitos a nivel del núcleo siempre y cuando el núcleo sea visible; y en los conteos no son considerados aquellos que a pesar de ser del grupo de oocitos a evaluar el corte es tangencial y solo se distingue el polo de la célula, con esto se disminuye la posibilidad de sobreestimar el grupo de oocitos. (Fig. 10)

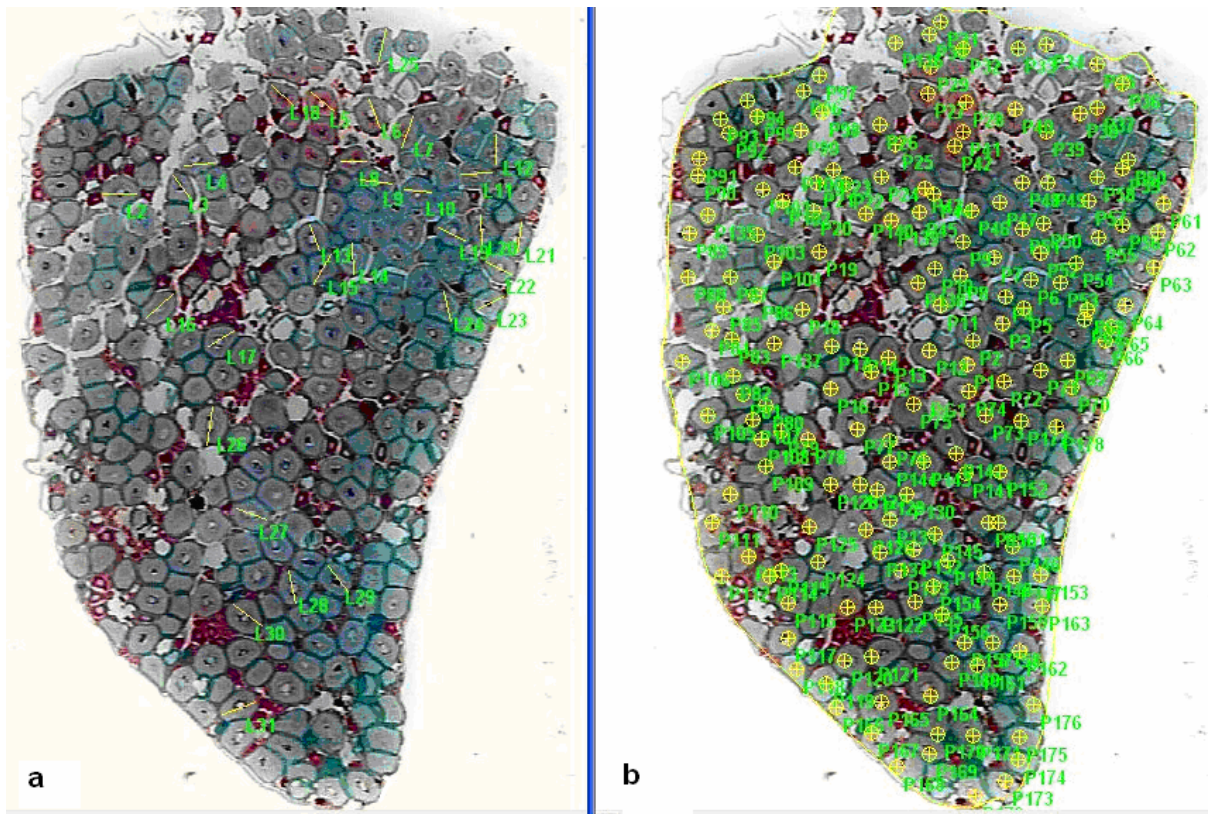


Figura 10. **a)** Registro al azar del diámetro de los oocitos del próximo desove a los cuales se les observara el núcleo. **b).** Oocitos numerados para la estimación de la fecundidad parcial individual.

Al considerar el área total del corte, en lugar de los cuadrantes, para el conteo de oocitos registrados en el disector, el modelo para estimar la densidad numérica por unidad de volumen se simplifica como sigue:

$$estN_v = \frac{1}{a * d} * Q$$

En donde :

$estN_v$  = número de oocitos por unidad de volumen.

$a$  = área total del corte.

$d$  = diámetro de los oocitos próximos al desove

$Q$  = número de oocitos próximos al desove con núcleo evidente.

Finalmente el número de células en el tejido es estimado a través de la siguiente expresión:

$$estN = estV_{ref} * estN_v$$

en donde:

$estN$  = número de oocitos.

$estN_v$  = número de oocitos por unidad de volumen.

$estV_{ref}$  = volumen del tejido de referencia (ovario)

En el caso del volumen de referencia del órgano (ovario), se utilizó directamente el peso del ovario.

Dada la alta probabilidad de que el corte sufra algún daño en el proceso histológico y disgregarse el tejido, se estimó el efecto en la estimación de la fecundidad parcial individual para porciones de los cortes de 100, 50 y 25% de la superficie total del corte. Tal como se ha descrito anteriormente, la profundidad se determina por el diámetro de los oocitos objetivo. Se procedió a hacer los conteos y las estimaciones

por triplicado en cada ovario de las 30 muestras elegidas al azar de entre las muestras seleccionadas para la estimación de la fecundidad parcial.

Con el objeto de observar de una manera gráfica la variabilidad biológica que presentan los valores de fecundidad parcial individual con forme avanza la temporada de reproducción, se realizaron diagramas de dispersión de éstos con respecto al peso libre de ovarios, destacando la etapa del estadio de madurez final en la que se encontraban.

Las estimaciones de parámetros numéricos que son abordados a través de la estereología deben de ser acompañados de una estimación de la precisión, estimando el coeficiente de variación (CV) que relaciona la variabilidad de los valores con respecto a la media. Asimismo se calculó el error estándar (SE) y el coeficiente de error (CE) con el objeto de estimar la variación en la población muestreada y la variabilidad introducida por el procedimiento de muestreo. (Howard y Reed, 1998).

$$CV = \frac{s}{x} \dots \quad SE = \frac{s}{\sqrt{n}} \dots \quad CE = \frac{s}{\sqrt{n} \cdot x}$$

Con base en la distribución de las tallas de los organismos muestreados, se reagruparon los valores de fecundidad parcial individual en tres grupos: el primero de 128 a 159 mm de longitud patrón, el segundo de 160 a 189 mm y el último de 190 a 210 mm de longitud patrón, con el objeto de minimizar el efecto de la variabilidad biológica asociada a la edad al momento de calcular el CE y el SE.

Para validar los resultados obtenidos con el método estereológico se realizó un análisis variancia con los valores de fecundidad parcial individual obtenidos en ambas metodologías, considerando al método gravimétrico como la metodología estándar. Mediante este análisis se somete a prueba la **H<sub>0</sub>** en la que se plantea que

no hay diferencias significativas en las estimaciones de fecundidad parcial obtenidas con ambos métodos.

Asimismo para determinar la confiabilidad en la predicción de las estimaciones de fecundidad hechas con el método estereológico, se utilizó un análisis de correlación y regresión a través del origen, entre las estimaciones de fecundidad obtenidas con ambos métodos y utilizando una prueba de t a fin de determinar si la pendiente obtenida difería significativamente de 1.0 (Zar, 1999).

Los valores de fecundidad parcial individual obtenidos con el método estereológico se correlacionaron con el peso libre de ovarios utilizando un análisis de correlación lineal simple, y con los coeficientes se calcularon los valores de fecundidad parcial a todas las hembras recolectadas agrupando los resultados por lance de pesca. Se calculó el valor promedio por lance y con estos valores obtener el valor promedio de la fecundidad parcial poblacional.

Finalmente con el objeto de reportar el valor de fecundidad parcial relativa poblacional para Bahía Magdalena en la temporada de reproducción 2006, utilizando los valores calculados por lance de pesca, aplicando la siguiente fórmula.

$$F_R = \frac{F_P}{(W_t - W_g)}$$

En donde:

$F_R$  = fecundidad relativa

$F_P$  = fecundidad parcial

$W_t$  = peso total del organismo

$W_g$  = peso de la gónada

Para comparar la eficiencia en tiempo empleado en la estimación de la fecundidad individual por ambos métodos, se registraron los tiempos de proceso. Para ambas metodologías se parte del análisis microscópico. En el caso del método gravimétrico se registró el tiempo desde el momento de obtener el peso de la alícuota hasta la obtención de los valores de fecundidad. Para el estereológico desde el momento en el que se obtiene la imagen, hasta la estimación de fecundidad parcial.

Para análisis estadístico de los datos se realizaron pruebas de normalidad Kolmogorov-Smirnof, estableciendo como nivel de significación  $p \leq 0.05$ . Para las pruebas estadísticas así como la elaboración de tablas y gráficos se utilizaron los siguientes programas: Statística ver. 9.9, Minitab ver 10.12. y Excel ver. 2003.

## Resultados

De 11 lances de pesca muestreados en Bahía Magdalena de enero a marzo del 2006, fueron analizados 821 ejemplares de sardina Monterrey durante la temporada de reproducción de la especie.

El análisis morfométrico mostró la incidencia sobre diferentes grupos de talla a los que tuvo acceso la pesquería. En enero capturaron sardinas con una talla entre los 160 y 195 mm de longitud patrón. En febrero, además se presentó otro grupo con mayor abundancia, de menor talla. Para el final de la temporada en el mes de marzo se presentó aparentemente un solo grupo que abarca desde los 130 mm hasta los 210 mm (Fig. 11).

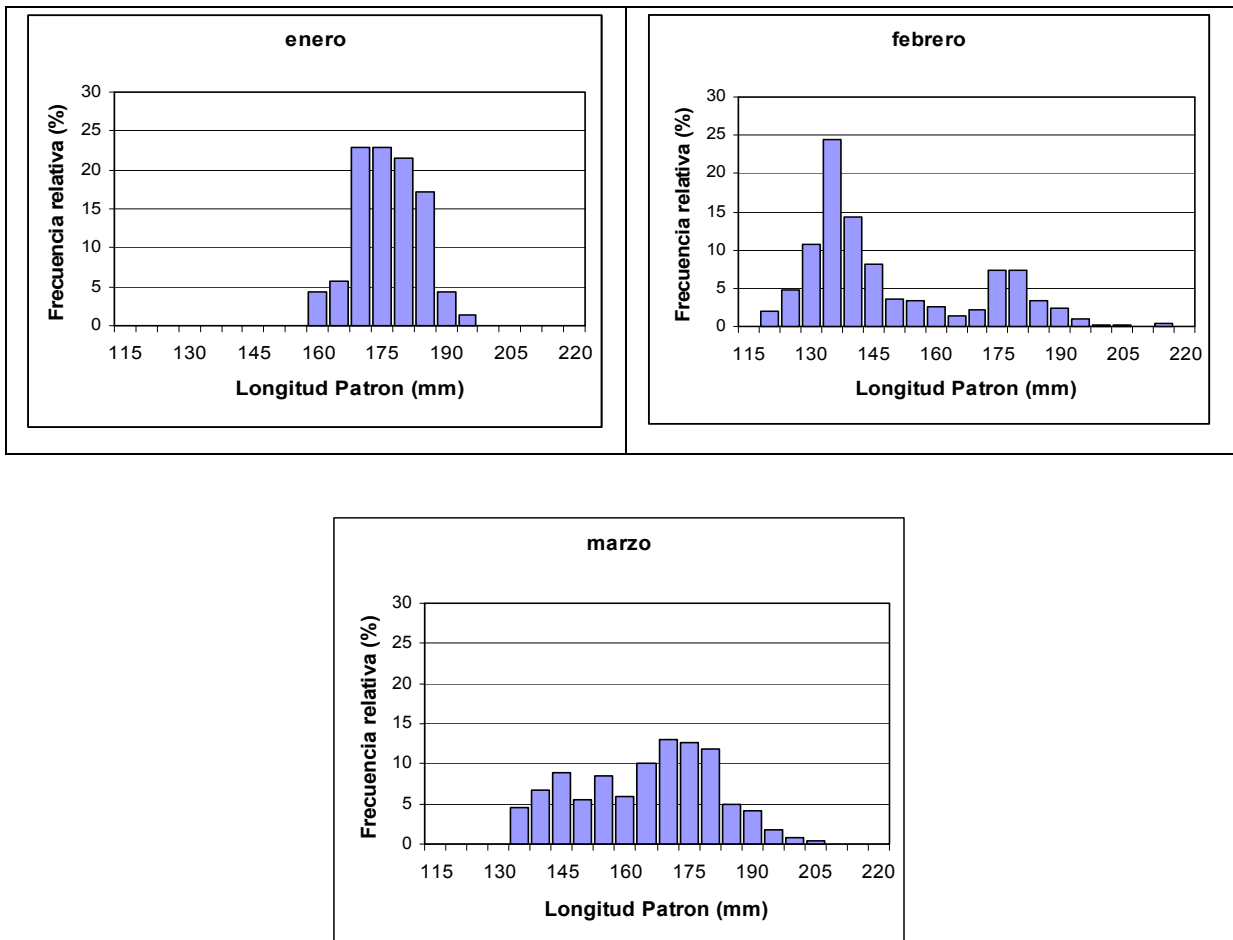


Figura 11. Distribución de tallas de la sardina Monterrey recolectada de Enero a Marzo de 2006 en Bahía Magdalena, B.C.S.

Como resultado del análisis histológico de 503 ovarios, en el total de la muestra se observaron las diferencias en la proporción de los estadios de maduración ovárica. El estadio de proliferación tuvo 21 y 6% en los meses de enero y febrero respectivamente, mientras que en marzo no se presentó ningún organismo en este estadio. Las mayores frecuencias de los estadios de crecimiento del oocito y desove, se registraron en el mes de febrero, no así para el estadio de madurez en donde la mayor proporción de esta se encontró para marzo (Fig. 12y Tabla II).

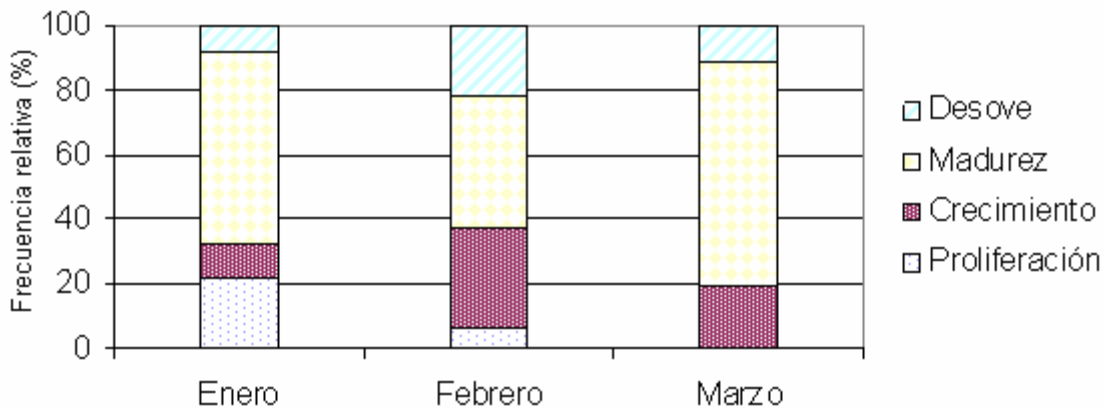


Figura 12. Proporción porcentual de los estadios de madurez observados durante la temporada de reproducción 2006 en Bahía Magdalena

Tabla II. Proporciones de los estadios de madurez en el ovario de *Sardinops sagax* de enero a marzo de 2006 en Bahía Magdalena, B.C.S.

	Enero	Febrero	Marzo
Proliferación	21.6	6.4	0
Crecimiento	10.8	30.6	19.1
Madurez	59.4	41.4	69.6
Desove	8.1	21.4	11.2

Con el análisis microscópico se determinaron las frecuencias de estadios de madurez, lo que permitió la selección de ovarios aptos para la estimación de la fecundidad parcial. Se seleccionaron un total de 211 muestras que se identificaron en el estadio de madurez final del oocito. Las etapas identificadas fueron: células granulosas altas, proteólisis inicial (integración de la gota de aceite), núcleo migratorio e hidratación mismas que no presentaron folículos post-ovulatorios ni



atrésia (Fig.13). La proporción porcentual de estas etapas del desarrollo en el total de muestras aptas para el estudio, se presentó como sigue: ovarios con células columnares alrededor del 22%; en proteólisis inicial un 36% y en núcleo migratorio e hidratación el 30 y el 11% respectivamente. La mayor parte de las muestras utilizadas para la estimación de fecundidad parcial se encontraban en proteólisis inicial y núcleo migratorio (Fig. 14 y Tabla III).

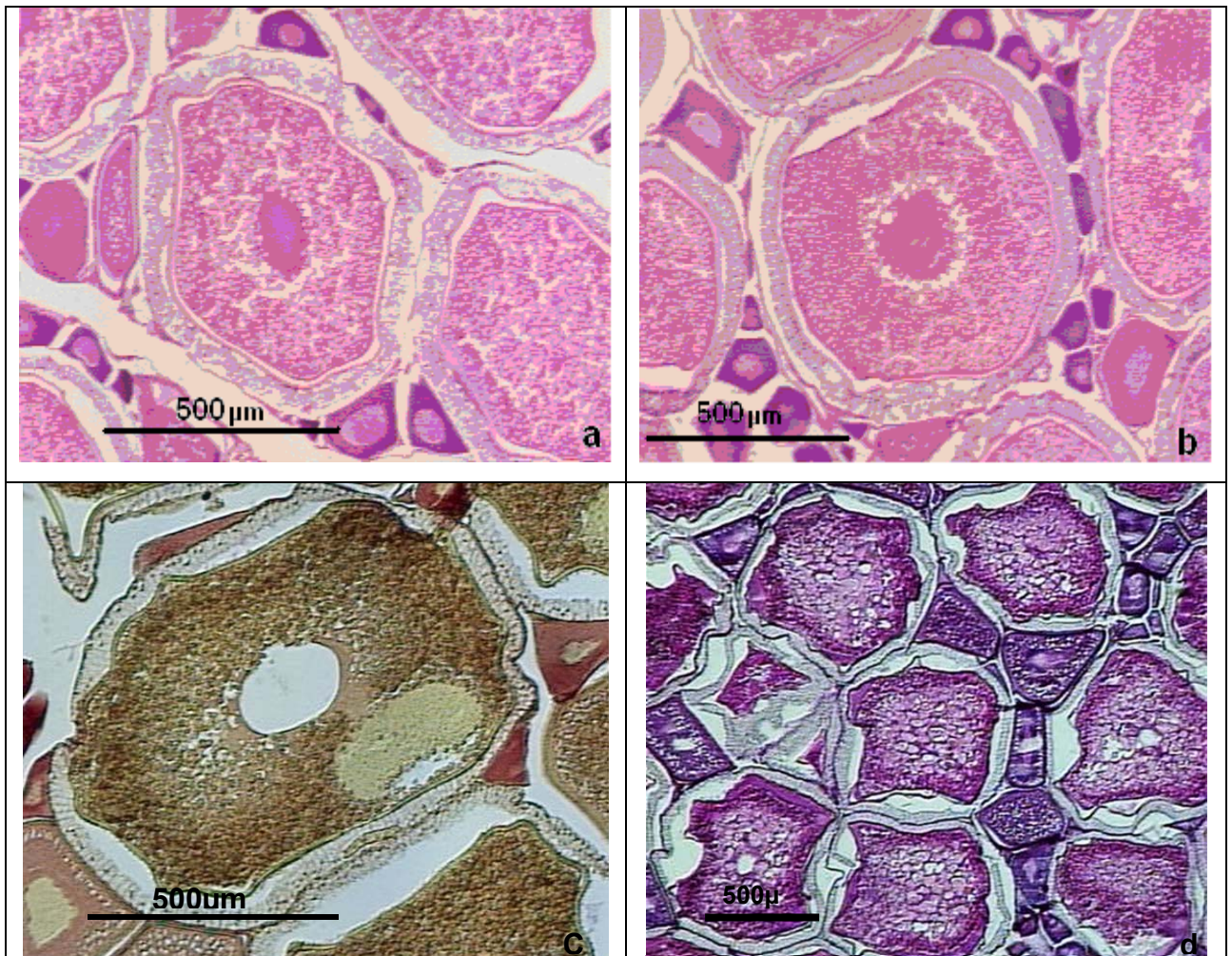


Figura 13. Imágenes al microscopio de las cuatro etapas del estadio de Madurez. a) Vitelogénesis final con las células de la granulosa altas, b) Proteólisis inicial (inicia la integración de la gota de aceite), c) Núcleo migratorio y d) hidratación .

Tabla III. Proporción de las etapas del estadio de madurez en la muestra, por mes y en general.

	Enero	Febrero	Marzo	Total
Cél. granulosas altas	36.8	33	8	22.2
Proteólisis Inicial	10.5	46	28	36
Núcleo Migratorio	0	8	61	30
Hidratación Inicial	53	13.5	0	11

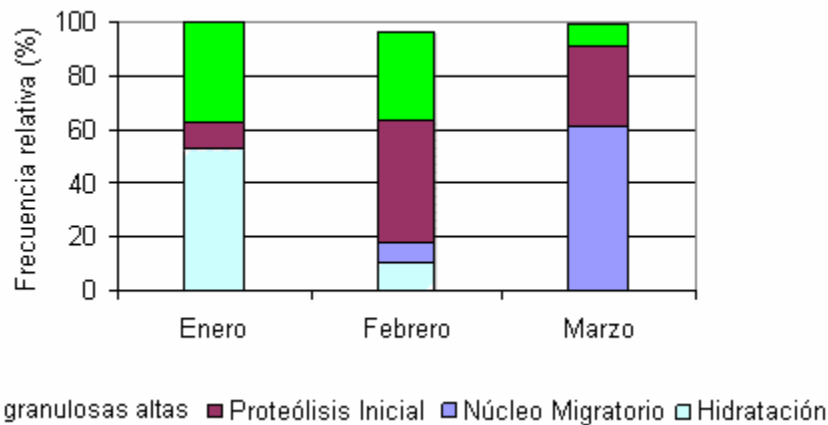


Figura 14. Distribución de frecuencias de las etapas del estadio de madurez en las que se encontraban las muestras para estimar la fecundidad parcial.

Los resultados obtenidos para la estimación de la fecundidad parcial individual mediante el método gravimétrico indicaron para el mes de enero un valor promedio de 16,043 oocitos por hembra. Para el mes de febrero el tamaño de muestra se incrementó a 103 hembras y su fecundidad parcial promedio se ubico en 11,092 oocitos por hembra. En marzo, se identificaron 91 hembras que registraron una fecundidad parcial promedio de 17,615. (Tabla IV)

Tabla IV. Valores de la fecundidad parcial individual de *Sardinops sagax* obtenidas por el método gravimétrico para la temporada de reproducción 2006, en Bahía Magdalena, B.C.S.

	Enero	Febrero	Marzo
promedio	16043	11092	17615
desviación	5360	5499	6998
máximo	3627	2915	4926
mínimo	25685	24674	25567
n	17	96	92

En los diagramas de dispersión de los valores de fecundidad parcial con respecto al peso libre de ovarios, se observa de manera gráfica la amplia variación que se presenta en cada mes analizado. En febrero se observa una mayor concentración de los valores que corresponden a las sardinas de menor talla. La dispersión se incrementa hacia marzo, el final de la temporada de reproducción (Fig. 15).

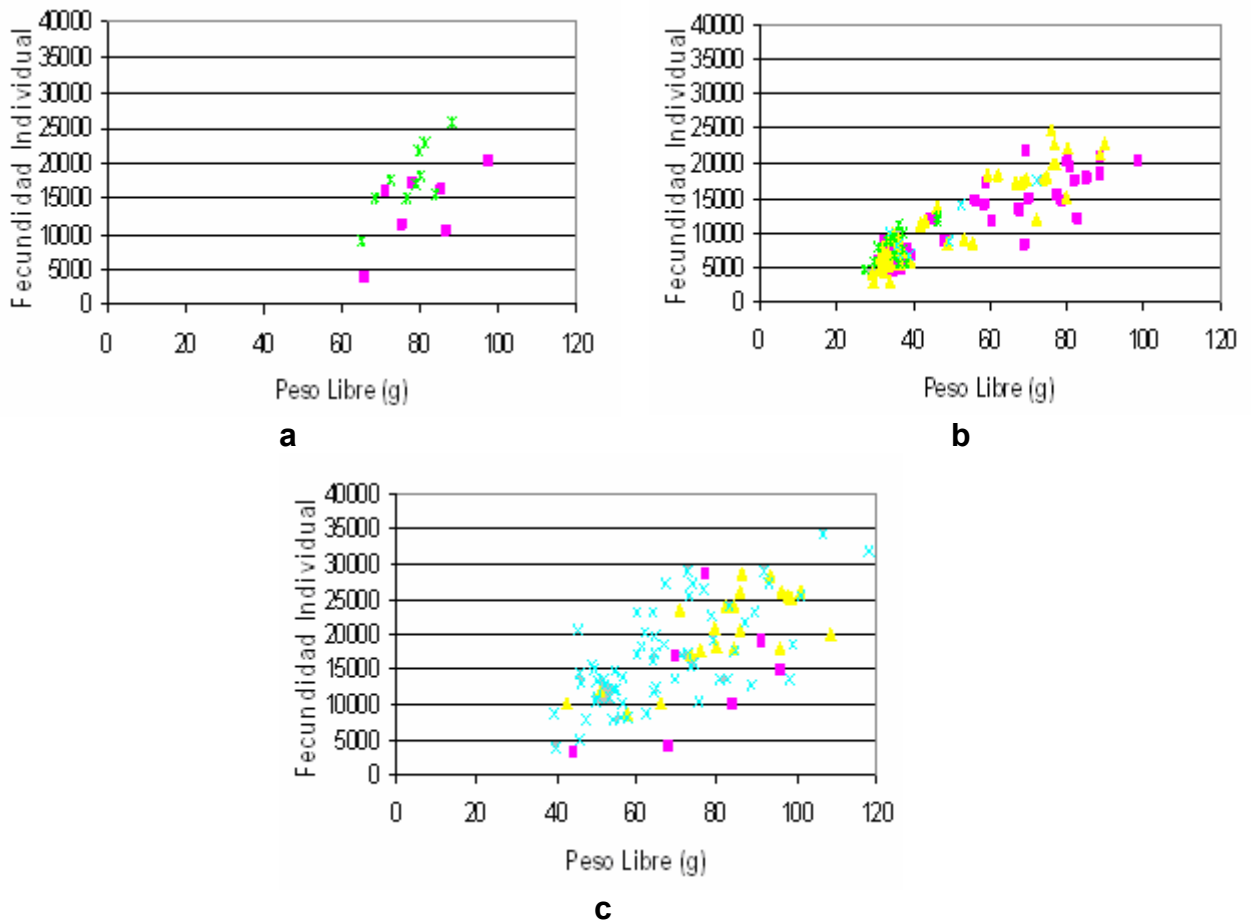


Figura 15. Diagramas de dispersión de la fecundidad parcial individual Vs Peso libre de ovarios de la sardina Monterrey para la temporada de reproducción 2006 en Bahía Magdalena, enero (a), febrero (b) y marzo (c) (■ Células granulosas Altas; ▲ Proteólisis inicial; × Núcleo migratorio; \* Hidratación).

Con el objeto de corroborar si existían diferencias significativas en las estimaciones de acuerdo a la etapa de madurez, el análisis de variancia de los valores promedio de la fecundidad parcial obtenida entre los cuatro grupos, clasificados de acuerdo

con la etapa de madurez: 1) células granulosas altas; 2) proteólisis inicial; 3) núcleo migratorio; 4) hidratación inicial,. No se encontraron diferencias significativas en las comparaciones pareadas (Fig. 16 y Tabla V).

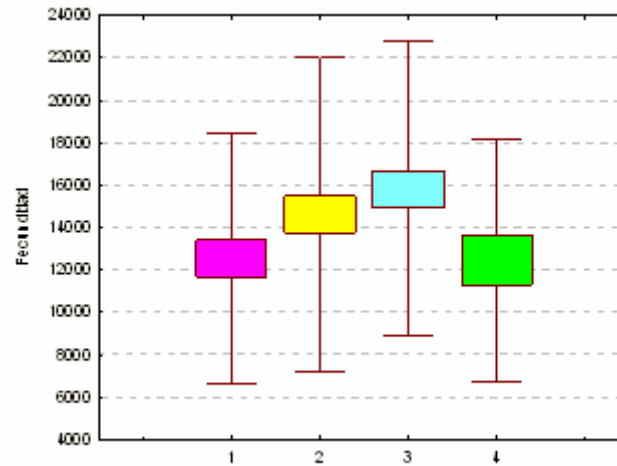


Figura 16. Valores promedio, desviación estándar, máximos y mínimos de la fecundidad parcial por etapas del estadio de Madurez. (■ Células Altas; ▲ Integración de la gota de aceite; × Núcleo migratorio; ✱ Hidratación inicial).

Tabla V. Niveles de significancia de las comparaciones pareada en el análisis de variancia de la fecundidad parcial.

Etapas	Vitelogenesis fina	Proteólisis inicial	Núcleo migratorio	Hidratación inicial
Vitelogenesis final		0.344630	0.065409	0.999973
Proteólisis inicial	0.344630		0.736690	0.527633
Núcleo migratorio	0.065409	0.736690		0.166377
Hidratación inicial	0.999973	0.527633	0.166377	

Al no encontrar diferencias significativas los datos se analizaron en conjunto, sometiéndolos primeramente a una prueba de normalidad de Kolmogorov – Smirnov. La probabilidad del estadístico  $d$  fue de 0.15, con lo que no se rechaza la hipótesis de distribución normal de la muestra (Fig. 17).

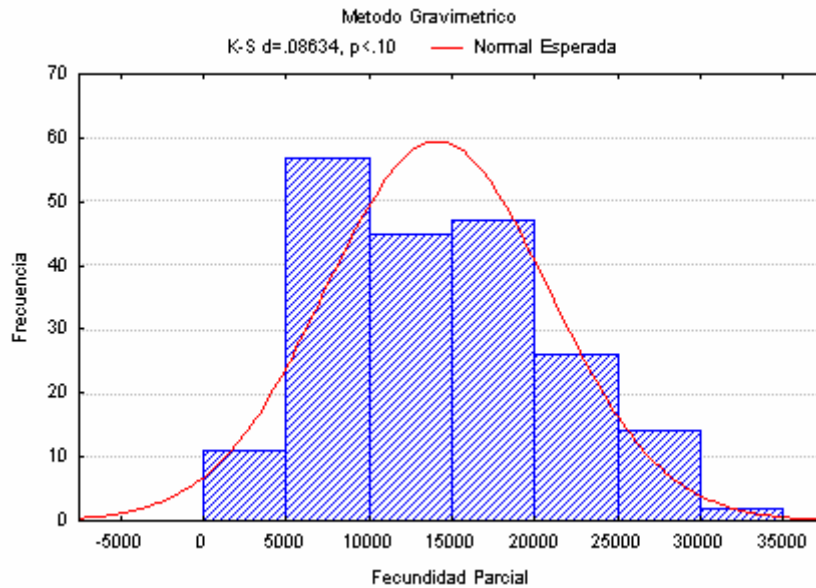


Figura 17. Prueba de Kolmogorov-Smirnov para el análisis de bondad en el ajuste a la distribución normal.

Los resultados obtenidos al eliminar la plantilla con los cuadrantes de muestreo, permitieron hacer una estimación de la fecundidad parcial individual comparable a los resultados del método gravimétrico. La unidad de muestreo se integró con la superficie total del corte, asignándole la profundidad individualmente a cada ovario dependiendo del diámetro de los oocitos próximos al desove, que a su vez esta en función de la etapa en la que se encuentren dentro del estadio de madurez final (Células granulosa altas, Integración de la gota de aceite, Núcleo migratorio e Hidratación inicial). En los conteos solo fueron considerados aquellos oocitos a los que se les observó claramente el núcleo, no así a los contornos que por el nivel del corte atravesaron el oocito tangencialmente en la región polar.

En algunas muestras no fue posible mantener la integridad del corte debido a que sufrieron daños durante el proceso de la técnica histológica para cortes en parafina. Estos daños son más probables al avanzar estado de madurez en los ovarios, de tal manera que se considero el área de muestreo a aquella sección del corte que mantuviera la integridad necesaria. Los resultados del ejercicio de tamaño mínimo de área del corte, utilizando 30 muestras, se calculó a partir de las estimaciones de

la fecundidad parcial individual con el 100, el 50 y el 25% de la superficie del corte. Los resultados al aplicarse la prueba t pareada, no demuestran diferencias significativas entre el tamaño de muestra del 100 y el 50 % de la superficie ( $p = 0.98$ ) Sin embargo, si se encontraron diferencias significativas entre los dos tamaños de muestra anteriores y el 25% de la superficie del corte ( $p = 0.00194$ ). En la tabla VI se presentan los valores de la prueba.

Tabla VI. Resultados de la prueba t pareada para el ejercicio de área mínima del corte para hacer la estimación de fecundidad parcial.

Prueba de t pareada para 100 y 50 %									
	x	ds	n	diff	sd dv diff	t	df	p	
100 %	15991.90	5736.818							
50 %	16001.75	4850.581	30	-9.85000	2374.712	-0.018550	29	0.985394	

Prueba de t pareada para 100 y 25 %									
	x	ds	n	diff	sd dv diff	t	df	p	
100 %	15991.90	5736.818							
25 %	18799.30	6458.722	30	-2807.40	3495.551	-3.59173	29	0.001945	

Los resultados sobre el factor de corrección por encogimiento del tejido al someterlo a la técnica histológica, mostraron un factor de corrección promedio de 0.128. En la Tabla VII se muestran los datos detallados de este análisis.

Tabla VII. Medidas tomadas del tejido antes y después del proceso histológico. a) Largo, b) ancho y c) alto, Ce= corrección de encogimiento.

Clave	Antes del proceso			Procesadas			VOL1	VOL2	Ce
	a	b	c	a	b	c			
A184M7	0.94	1.2	0.25	0.92	1.18	0.22	0.28	0.23	0.15
A184M58	0.81	1	0.66	0.78	0.94	0.61	0.53	0.44	0.16
A187M2	1.14	1.06	0.63	0.97	1.09	0.62	0.76	0.65	0.13
A187M6	1.1	0.84	0.58	1.07	0.8	0.54	0.53	0.46	0.13
A187M10	1	1.09	0.31	0.98	1.04	0.3	0.33	0.30	0.09
A187M35	0.99	1.65	0.4	0.93	1.66	0.38	0.65	0.58	0.10
A187M44	1.04	0.8	0.5	0.97	0.77	0.48	0.41	0.35	0.13
A187M49	1	0.9	0.4	0.99	0.8	0.39	0.36	0.30	0.14
A187M350	0.9	0.9	0.54	0.89	0.87	0.52	0.43	0.40	0.07

Las estimaciones fecundidad parcial se hicieron utilizando los tres cortes por ovario, al igual que los resultados obtenidos con el método gravimétrico, no se encontraron diferencias significativas en la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov ( $p < 0.20$ ) (Fig. 18). En la tabla VIII, se presentan los valores promedio por mes.

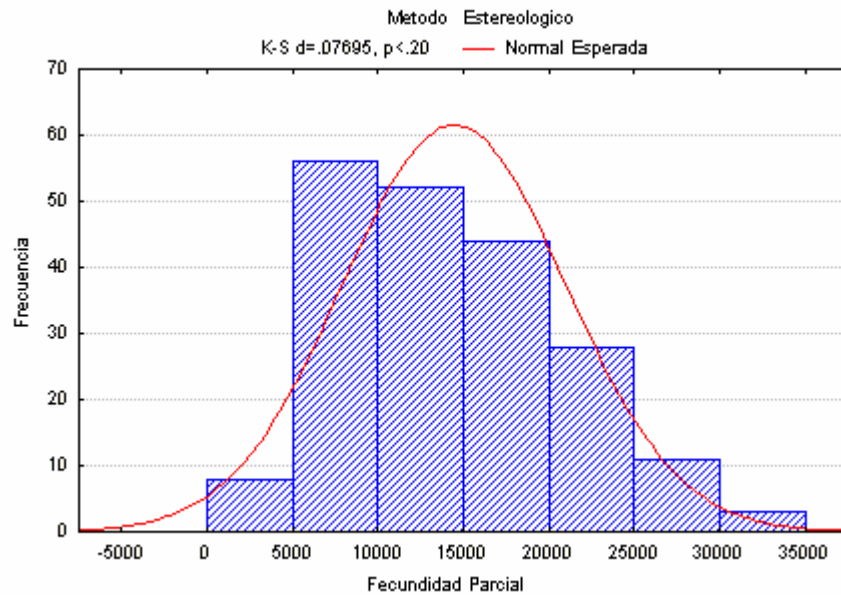


Figura 18. Prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov de la fecundidad parcial individual estimada por estereología.

Tabla VIII. Valores de fecundidad parcial individual por mes obtenidos a través del método estereológico.

	Enero	Febrero	Marzo
promedio	15,719	11,524	17,595
ds	5,158	5,202	6,695
máximo	24,470	25,960	33,507
mínimo	11,265	3,995	2,932
n	17	96	92

En 6 muestras de ovario en hidratación, correspondientes al mes de febrero, al aplicar el método estereológico, se obtuvieron valores marcadamente diferentes con respecto a los obtenidos aplicando el método gravimétrico, y dado que en ninguna

de las 205 muestras restantes se presentó una diferencia tan amplia en las estimaciones cabría la posibilidad de que existiera un error de aplicación en alguno de los dos métodos, por lo que se decidió que fueran eliminadas del análisis (Tabla IX).

Tabla IX. Valores de fecundidad parcial individual de las seis muestras eliminadas del análisis, que se encontraban en la etapa de hidratación.

No. Muestra	Gravimétrico	Estereológico
217	5,586	10,437
245	5,676	8,974
313	7,790	17,201
319	5,733	13,813
360	8,624	14,586
367	4,648	8,273

Como resultado del análisis de variancia para comparar los valores de fecundidad parcial individual promedio obtenidos con ambos métodos, no se encontraron diferencias significativas ( $p = 0.53$ ) en la figura 19 y la tabla X se presentan los resultados de éste análisis.

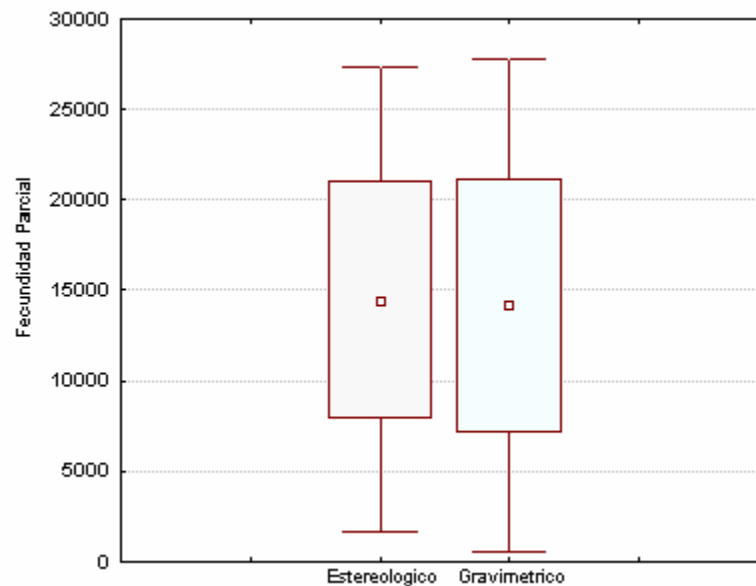


Figura 19. Comparación de los valores promedio de las estimaciones de fecundidad parcial individual obtenida por ambos métodos.



Tabla X. Resumen de resultados del análisis de variancia de la fecundidad parcial individual estimada con ambas metodologías.

<i>Métodos</i>	<i>n</i>	<i>Sum</i>	<i>Media</i>	<i>Variancia</i>
Estereológico	205	2937940	14544.26	43234240
Gravimetrico	205	2854847	14132.91	45865576

<i>Fuente de variacion</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F critica</i>
Entre grupos	17090018	1	17090018	0.383615	0.536026	3.864694
Dentro de grupos	1.79E+10	408	44549908			
Total	1.79E+10	409				

El resultado del análisis de regresión para observar la confiabilidad en la predicción, entre ambos métodos, arrojo un resultado significativo, ubicándose el valor de correlación en  $r = 0.96$ , y el valor de la pendiente ( $b = 0.98$ ). La prueba de t aplicada para determinar si este valor de la pendiente difería de 1.0, no arrojó un resultado significativo, concluyéndose que no existe evidencia para decir que hay diferencias en los valores de fecundidad parcial individual predichos con ambos métodos. (Fig. 20).

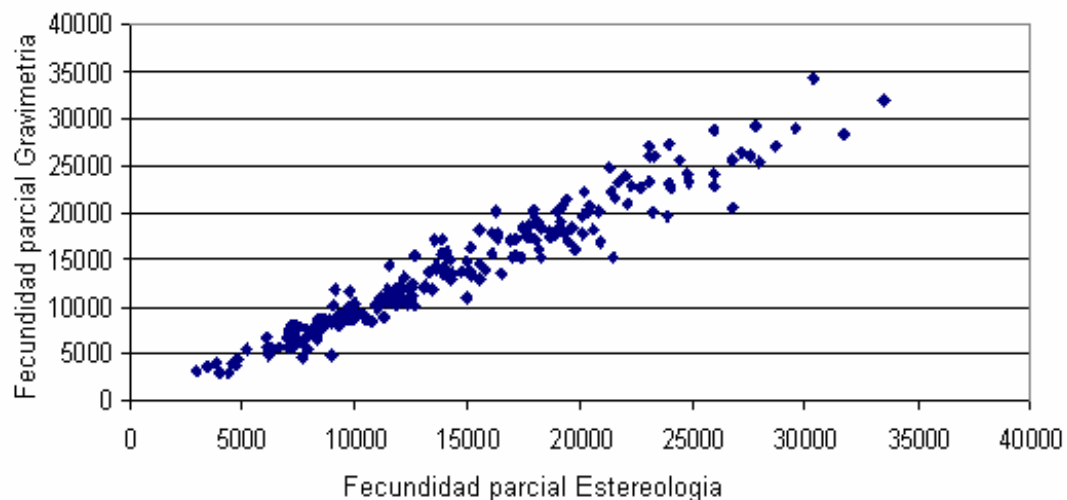


Figura 20. Grafica de dispersión de los valores promedio de fecundidad parcial individual en el análisis de regresión con ambos métodos.

El valor promedio del coeficiente de variación (CV), calculado para las estimaciones por el método estereológico, con el que se estima la proporción de la variación entre las muestras para cada ovario, se ubicó en 5.6% para los 205 ovarios. Dado que se observa una gran variabilidad biológica en los datos de fecundidad parcial, los valores del error estándar (SE) y el coeficiente de error (CE) se obtuvieron por intervalo de talla con el objeto de minimizar la variabilidad asociada con la edad. El criterio de separación de los grupos fue siguiendo la distribución de tallas de toda la muestra (Fig.11), en donde se observan claramente diferentes grupos modales. El primero en donde se ubican los organismos entre los 120 y 160 mm de longitud patrón, el segundo grupo entre los 160 y 190 mm y el tercero representado por unos cuantos individuos por arriba de los 190 mm de longitud patrón (Fig. 21).

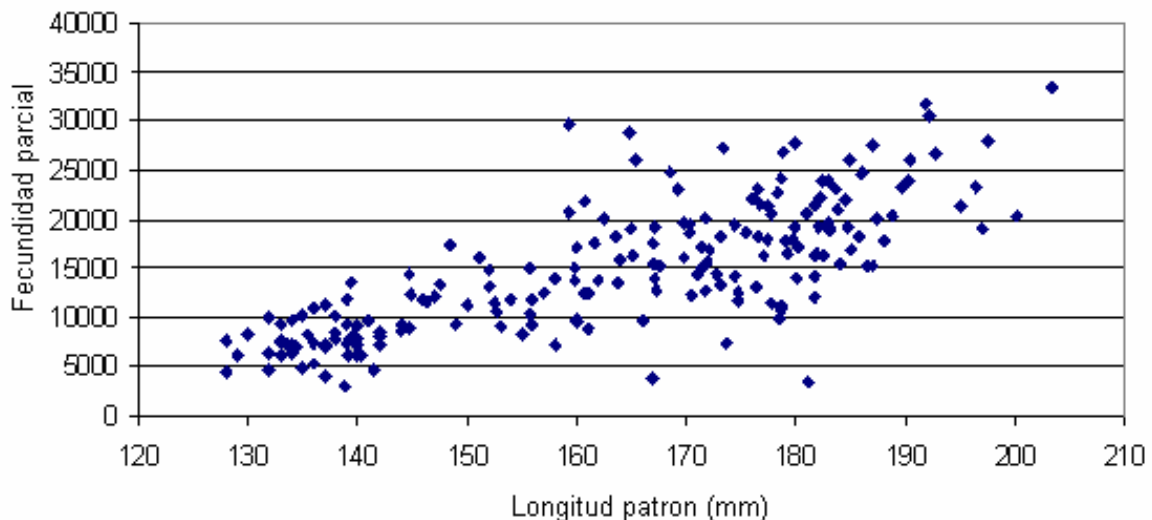


Figura 21. Valores de fecundidad parcial de la sardina monterrey estimadas por estereología, graficadas con respecto a la talla.

En general la variabilidad estimada en los valores promedio separados por grupo de talla de la fecundidad parcial individual con respecto a la media poblacional reflejada por el CE se observa que la precisión se incrementa en la medida en la que aumenta el tamaño de la muestra, aunque no es proporcional (Tabla XI).

Tabla XI. Cálculos del coeficiente de error y el error estándar para los valores de fecundidad parcial individual por rango de talla, estimados con estereología.

Longitud patron (mm)	Fecundidad Promedio	Desv. Estand.	n	SE	CE
128-159	9567.26	3916.74	84	427.35	0.044
160-189	17609.71	5062.77	110	496.44	0.028
190-210	25848.97	4762.67	11	1436	0.055

En cuanto a los tiempos de procesamiento, para el método gravimétrico se cuantificó de 10 a 12 minutos por muestra, desde obtener el peso de la muestra, disgregarla, separarla en pequeñas porciones y alinearlas para facilitar el conteo, hasta realizar el conteo de los oocitos. Para el estereológico se requirieron 5 minutos por muestra, desde la obtención de la imagen, el procesamiento digital, obtención de la superficie de muestreo y el cálculo de la fecundidad parcial.

Con base en los resultados anteriores, al no encontrar diferencias significativas en los resultados aplicando ambos métodos, se utilizaron los valores obtenidos por estereología para calcular la fecundidad parcial para la población de sardina Monterrey en la temporada de reproducción 2006, en Bahía Magdalena. Utilizando los coeficientes del modelo de correlación lineal simple de la fecundidad parcial individual contra el peso libre de ovarios, se calculó la fecundidad parcial por lance de pesca con la totalidad de las hembras muestreadas (Fig. 22).

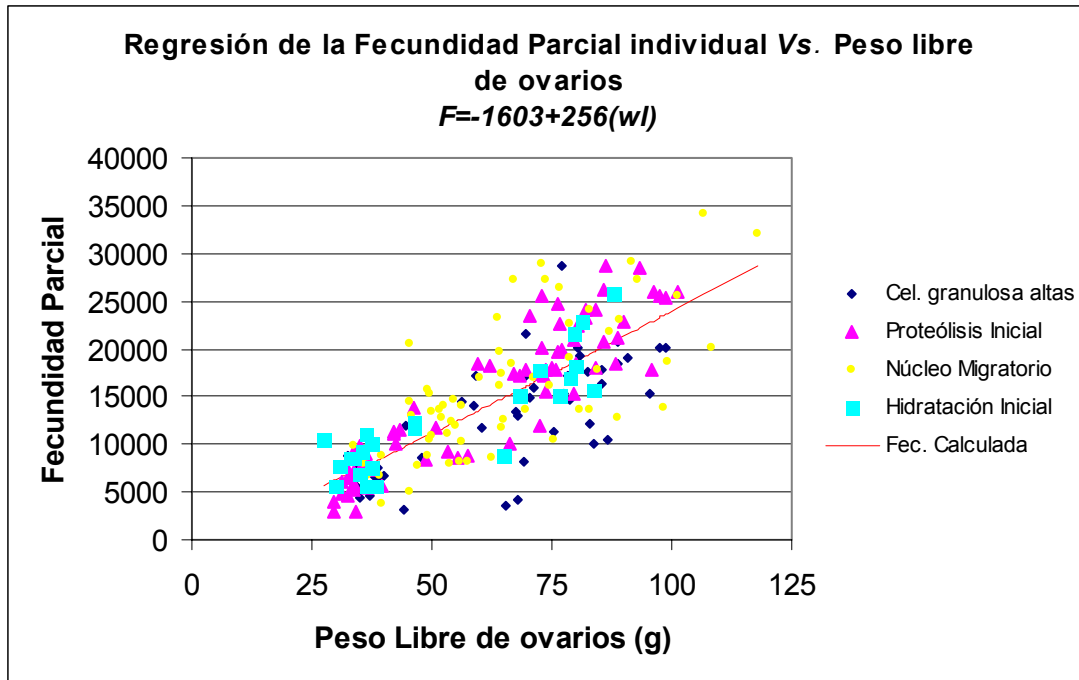


Figura 22. Dispersión de datos y línea de regresión de la Fecundidad parcial individual y el Peso libre de ovarios, ajustada con el modelo lineal.

En la tabla XII, se presentan la fecundidad parcial por lance de pesca, calculada con todas las hembras que se recolectaron en dichos lances utilizando los coeficientes del modelo de correlación lineal simple, entre la fecundidad parcial individual y el peso libre de ovarios.

Tabla XII. Tabla de valores calculados de fecundidad parcial promedio ( $F\bar{x}$ ), desviación estandar (ds) y fecundidad relativa, por lance de pesca.

<i>Mes</i>	$F\bar{x}$	<i>ds</i>	<i>Fec. relativa</i>
Ene	18,131	2600	220
Ene	20,206	2891	222
Feb	7,128	1714	204
Feb	6,380	2088	203
Feb	9,276	1943	209
Feb	7,327	886	205
Feb	17,778	2847	220
Feb	13,116	5725	216
Mar	15,182	5135	218
Mar	18,648	4665	221
Mar	18,278	4539	221
Mar	15,780	4562	218

Finalmente el valor de la fecundidad parcial promedio para la población de *Sardinops sagax* en Bahía Magdalena, durante la temporada de reproducción 2006, fue de 15,203 oocitos por hembra. La fecundidad parcial relativa promedio se calculó en 234 oocitos por gramo de hembra.

## Discusión

La base de la estereología consiste en la exploración del espacio tridimensional a partir de cortes bidimensionales con el fin de estimar, a partir de una muestra de dos dimensiones, la proporción del área, volumen, longitud y número que ocupa un componente incluido en una matriz.

Varios autores proponen el método estereológico del disector físico para la estimación de la densidad numérica. Se trata de una herramienta con una gran solidez estadística, que considera el muestreo al azar y sistemático, siempre eliminando la posibilidad de sesgo. A partir de lo anterior, se obtienen resultados en menor tiempo, el procedimiento es repetible y, de forma particularmente importante, se mantiene la identificación plena de la estructura objetivo, cuyo contorno pueda abarcar uno o más cortes (Gundersen y Østerby, 1981; Sterio 1984; Gundersen 1986, 1987 y Andersen, 2003). Cabe señalar que, la mayoría de los trabajos y ejemplos utilizados para el análisis de la metodología, están realizados con tejidos neuronales o renales, cuyos elementos tienen una baja densidad y su conformación facilita considerablemente la discriminación de las células que participan en los conteos.

Para el presente trabajo, inicialmente se siguió el procedimiento descrito para la aplicación del disector físico (Howard y Reed, 1998 y Andersen 2003), pero tanto la densidad de oocitos maduros que se presentan en un ovario próximo al desove, como la homogeneidad en el tamaño y la forma de las células, resultaron ser características con algunos inconvenientes; particularmente al momento de discriminar claramente, dentro de la unidad de muestreo formada por el disector, a las células que deberían ser consideradas, o no, en los conteos. Este proceso de discriminación requiere una gran cantidad de tiempo, que posiblemente se logre disminuir en la medida en la que el observador adquiera habilidad para distinguir las células. Por otro lado, los valores de fecundidad parcial obtenidos al aplicar esta metodología, en algunos casos apenas fueron la cuarta parte de los valores

obtenidos con el método gravimétrico. Este resultado posiblemente se debió al reducido tamaño de los cuadrantes de la rejilla utilizado para el muestreo sistemático, y a la falta de precisión en los conteos, derivada de la dificultad de identificar las células en los diferentes cortes.

Ante este resultado, se aplicó un método alternativo, con el que se realizaron ajustes a la metodología en relación con la proporción que guarda el tamaño de las células con la superficie de muestreo. El diámetro total de los oocitos fue utilizado para asignar la profundidad de campo, en lugar de  $\frac{1}{3}$  o un  $\frac{1}{4}$  del diámetro de los oocitos propuesto por Howard y Reed, (1998) y por Andersen (2003) para la aplicación del disector. El diámetro total de los oocitos como profundidad del corte, ha sido utilizado por Emerson *et al.*, (1990), Walker *et al.*, (1994) y Coward and Bromage (1998) en trabajos que utilizan la estereología para la estimación de fecundidad en peces, recurriendo al modelo propuesto por Weibel y Gomez (1962). Este modelo, además de usar el valor del diámetro de las células para asignar la profundidad al área de muestreo considera, como coeficientes de corrección, al factor de forma de los elementos a evaluar y a la distribución de sus diámetros, factores que no fueron aplicados en el presente trabajo, dada la homogeneidad en la forma de los oocitos en las etapas finales del estadio de madurez y que tampoco son incluidos en el modelo del disector físico.

Otro ajuste consistió en ampliar el área a la totalidad de la superficie del corte. Bajo este esquema, la densidad de oocitos en el corte fue estimada mediante un censo, en vez de utilizar la plantilla del muestreo al azar. Los conteos se realizaron con todos los oocitos próximos al desove a los que se les observara el núcleo.

A partir del método estereológico alternativo antes indicado, se obtuvieron estimaciones de la fecundidad individual de la sardina monterrey que no fueron significativamente diferentes de las obtenidas con el método gravimétrico. Los únicos seis valores cuyas diferencias fueron muy amplias, correspondieron a aquellas hembras que se clasificaron en la etapa de hidratación. En las preparaciones histológicas se observó

que se trataba de oocitos que habían incrementado su diámetro, con evidente avance de la acción enzimática del proceso de proteólisis. En estas condiciones, los oocitos adquieren mayor volumen y peso. Será necesario dedicar un cuidadoso análisis en la estimación de la fecundidad en esta etapa de la madurez final, debido a que la densidad de estos oocitos se modifica por el incremento hasta en un 100% del diámetro, de tal manera que el tamaño de muestra mínima representativa sea diferente dado el cambio en densidad y forma, debido a que los oocitos hidratados son sumamente irregulares en su forma.

Los valores obtenidos tanto en el coeficiente de variación, por un lado apuntala el hecho de que son suficientes tres cortes de un lóbulo del ovario, ya que los valores promedio no se modificaran aun cuando se aumentara el número de cortes para la estimación individual.

La fecundidad de los peces asincrónicos presenta una alta variabilidad, la cual se asocia a factores como la edad, disponibilidad de alimento, temperatura, la dinámica energética individual y a la capacidad de administrar esta energía, consideradas como adaptaciones en el esfuerzo reproductivo como respuesta a factores ambientales, lo cual puede reflejarse en el tamaño de los oocitos y en el potencial reproductivo (Hunter y Leong, 1981; Parrish *et al.*, 1986; Tanasishuk and Ware, 1987; Torres-Villegas, 1997 y Perezgómez, 2004). La amplia variación en la tasa de producción que se presenta a lo largo de la temporada de puesta también se observa interanualmente (Alheit, 1984, Claramunt *et al.*, 1993, Torres-Villegas y Perezgómez, 1988). En suma, se trata de una característica sujeta a fuertes presiones de selección: depredación, disponibilidad de alimento, variables ambientales; factores fundamentales para la supervivencia y crecimiento de la progenie, además de la propia, pues se trata de una especie clasificada como iterópara (Munro, 1990).

Al separar los datos por grupos de tallas para acotar la variabilidad en los valores de fecundidad, se observó que los valores del coeficiente de error (CE) se reducen,



dado que se eliminó la variabilidad biológica introducida por las diferencias en la estructura de tallas que se presentó en la muestra, considerándose además, que las muestras provienen de diferentes momentos de la temporada de reproducción.

La correlación y la regresión entre ambas metodologías permite validar la aplicación del método estereológico para la estimación de la fecundidad parcial individual de *Sardinops sagax*. Emerson et al. (1990), compararon estimaciones de fecundidad obtenidas con un contador de partículas, con el método de la moda más avanzada por volumetría, y con un método estereológico. Encontraron que no había diferencias significativas en las estimaciones por los distintos métodos en *Dover sole L.*, no obstante, en *S. scombrus L.* si encontraron diferencias significativas entre el método estereológico y el volumétrico, y lo atribuyen a que en el método volumétrico se establecen límites para la talla promedio de las partículas a estimar, dejando de contabilizar algunos oocitos vitelogénicos, sobre todo cuando en la distribución de frecuencias se encuentran traslapados los oocitos previtelogénicos y los vitelogénicos. . A pesar de esta diferencia, resaltan las ventajas del método estereológico sobre los otros métodos y discuten su potencial aplicación. Las ventajas se refieren a que la estimación del número de partículas por estereometría se realiza tomando en cuenta las características morfológicas intrínsecas de las partículas. Lo anterior se pierde irremediablemente en cualquiera de los otros métodos, lo que introduce una cantidad de incertidumbre en las estimaciones.

Lo anterior es semejante a lo que se encontró en el presente trabajo. En este caso, las ventajas del método estereológico utilizado, junto con la aplicación del análisis digital de las imágenes, agilizaron la aplicación de la estereología.

En comparación con el método gravimétrico, el método estereológico aplicado en este estudio permitió reducir considerablemente (hasta 50%) el tiempo de procesamiento de las muestras. Ello significa una reducción importante en los costos (horas-hombre) asociados al personal requerido para la estimación de la fecundidad de la sardina monterrey, sin detrimento de la precisión.

En la manipulación del tejido en fresco con el método gravimétrico, se presentan diferentes situaciones que pueden alterar la precisión de los resultados. Por ejemplo, el no obtener el peso de la alícuota rápidamente propicia que, tratándose de una cantidad tan pequeña de tejido, se pierde rápidamente humedad y peso, siendo necesario agregar mas tejido para obtener el peso de la muestra. También, una vez obtenida la muestra, es necesario disgregar y acomodar los oocitos de tal manera que se facilite el conteo. Esta una de las partes del proceso en el que se emplea una gran cantidad de tiempo.

Los valores promedio de fecundidad parcial estimados en este trabajo, se ubicaron dentro de los intervalos que se han registrado para la sardina en la zona de estudio (Torres-Villegas, 1986; Perezgómez, 2004 y Moguel-Hernández. 2007) con la tendencia y amplitud esperadas, tanto en la distribución de los valores, como en la variabilidad de los mismos.

Los resultados aquí presentados, sugieren la posibilidad de estimar las poblaciones celulares así como otros elementos del tejido ovárico en la sardina monterrey. Lo anterior se ha propuesto con ajustes en la profundidad de la unidad de muestreo así como calibraciones de la forma y distribución de las estructuras a evaluar. Es un hecho que el método estereológico junto con la posibilidad del análisis digital de imágenes, permiten el desarrollo de una valiosa herramienta para optimizar la estimación de la fecundidad parcial con alta precisión. Mas allá de los análisis cuantitativos, puede tener un potencial adicional si se plantea estimar los procesos que controlan la producción de oocitos, definida por la fecundidad parcial y la frecuencia de desovantes. Lo anterior pudiera permitir nuevas hipótesis para abordar los temas relacionados con los mecanismos que controlan el tamaño de las poblaciones de sardina.

En México la aplicación del MPDH data de 1986 (Torres-Villegas, 1986), lo cual ha proporcionado datos que norman los criterios para establecer políticas de manejo en las pesquerías, basadas en el tamaño de la población desovante. Lo riguroso de

los procedimientos para la obtención de los parámetros del modelo y los elevados costos en su aplicación han sido los criterios para rechazar su utilización, sin embargo la confiabilidad de los resultados hace necesaria la búsqueda de alternativas de diferente índole, tanto en la metodología aplicada para las campañas de muestreo y el proceso de la información; tendientes a reducción en costos y tiempo, como en la profundidad de los temas analizados.

A nivel mundial existe la preocupación por mantener el equilibrio ecológico, ejerciendo una pesca responsable. Uno de los puntos centrales en la Convención de las Naciones Unidas sobre el Derecho del Mar de 1982 (UN-CONVEMAR) fue la discusión sobre la ordenación pesquera nacional e internacional, en donde se compromete a los Estados a desarrollar e implementar estrategias, planes y programas que conduzcan a una pesca sustentable. Estos objetivos han sido ratificados y ampliados en el artículo 17 de la Agenda 21 (UN-Plan de acciones para el desarrollo sustentable, 2002) en diferentes cumbres (1989, 1992, 1995, 2002) así como en el Código de Conducta para la Pesca Responsable (FAO, 1995) y El Principio Precautorio en la Regulación de la Pesca de Alta Mar. Estos tratados obligan a los estados que se inscriben a dedicar esfuerzos y recursos para la investigación pesquera, lo que propicia iniciativas de investigación para generar conocimiento científico y tecnológico y ofrecer herramientas para un mejor manejo de los recursos.

## Conclusiones

- Queda demostrado que es factible aplicar métodos estereológicos para la estimación de la fecundidad parcial, utilizando las imágenes al microscopio de cortes histológicos de ovarios en el estadio de madurez final de la sardina monterrey.
- La utilización del disector físico como unidad de volumen para la estimación de la densidad numérica, se dificulta enormemente; en tejidos con una densidad tan alta como el ovario en estadio de madurez final, la discriminación de las células que intervienen en los conteos, dada la homogeneidad en la forma, es un proceso que consume una gran cantidad de tiempo.
- A través de la técnica estereológica, la estimación de la fecundidad parcial utilizando la superficie total del corte, el diámetro de las células de interés como profundidad de corte e incluyendo en los conteos solo aquellos oocitos en donde se observe claramente el núcleo, se obtuvieron resultados que fueron validados realizando conteos directos utilizando el método gravimétrico, con un alto nivel de confianza.
- Estadísticamente No se rechaza la ***H<sub>0</sub>***, en donde se plantea que no existen diferencias significativas entre los valores de fecundidad parcial obtenida con los métodos gravimétrico y estereológico.

## Recomendaciones

--- El ovario en madurez avanzada es un tejido sumamente delicado, es necesario que el proceso histológico se lleve a cabo con sumo cuidado, sobre todo si los cortes son en parafina. Lo recomendable sería hacer cortes en resina.

--- Es indispensable conocer el tamaño de los elementos a evaluar antes de realizar los cortes histológicos, para la plantación de la separación adecuada entre los tres cortes recomendados como muestra mínima en este trabajo.

--- Es muy importante mantener la integridad del corte, debido a la necesidad de contar con el cálculo de la superficie.

--- Para facilitar el análisis digital de las imágenes, se recomienda utilizar técnicas de tensión tricrómicas para aumentar el contraste entre los diferentes componentes celulares.

## Bibliografía

- Alheit, J. 1987.** Variation of batch fecundity of sprat *Sprattus sprattus* during spawning season. ICES, C.M. 1987/H:44 Pelagic Fish Committee.
- Alheit, J. 1993.** Use of the daily egg production method for estimating biomass of clupeoid fishes: A review and evaluation. Bull. Mar. Scie. 53(2):750-767.
- Alvarez-Borrego, S., A. Galindo y A. Chee. 1975.** Características hidroquímicas de Bahía Magdalena, Baja California Sur. Cienc. Mar. 2(2): 94-110 p.
- Andersen, T.E. 2003.** Unbiased stereological estimation of cell numbers and volume fractions: the disector and principles of point counting. In *Modern Approaches to Assess Maturity and Fecundity of Warm and Cold Water Fish and Squids* (Kjesbu, O.S., Hunter, J.R. and Witthames, P.R., eds). Fisker og Havet 12, 11-18.
- Bagenal, T.B. 1957.** Annual variations in fish fecundity. J. Mar. Biol. Ass. U. K. 36,377-382.
- Bagenal, T. B. 1966.** The ecological and geographical aspects of the fecundity of the plaice. J. Mar. Biol. Ass. U. K. 46, 161-186.
- Bagenal, T. 1978.** Methods for assessment of fish production in fresh waters. 3er ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Beacham, T. D. and C. B. Murray 1993.** Fecundity and egg size variation in North American Pacific salmon (*Oncorhynchus*) J. Fish. Biol. 42, 485-508.
- Begega, A., R. Miranda. S. Rubio, J. L. Santón, M. Cuesta y J. L. Arias. 2000.** Aplicación de la estereología en la psicobiología. Revista Electrónica de Metodología Aplicada. 3 (1), pp 30-40.
- Beverton, R. J. H. 1990.** Small marine pelagic fish and the thread of fishing: are they endangered?. J. Fish Biol., 37 (suppl A) 3-16.

- Claraumnt, G. and G. Herrera. 1993.** Fluctuations of the partial fecundity in the Spanish sardine (*Sardinops sagax*) during the main spawning season 1990, in the northern region of Chile. *Scientia Marina* 57: 9-14.
- Claramunt, G., R. Roa and L. Cubillas. 2003.** Estimating daily spawning fraction using the gonadosomático index: application to three stocks of small pelagic fish from Chile. In *Modern Approaches to Assess Maturity and Fecundity of Warm and Cold Water Fish and Squids* (Kjesbu, O.S., Hunter, J.R. and Witthames, P.R., eds). *Fisken og Havet* 12, 43-49.
- CONAPESCA-SIRIAP 2007.** Informes de los volúmenes de captura de los recursos pesqueros. <http://www.sagarpa.gob.mx/conapesca/>
- Coward, K., and N. R. Bromage. 1998.** Histological classification of oocyte growth and the dynamics of ovarian recrudescence in *Tilapia zillii*. *J. Fish. Biol.* 53, 285-302.
- Crim, F.N. and D.B. Glebe 1990.** Reproduction. In: C.B. Schreck and P.B. Moyle (editors): *Methods for fish biology*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland. p. 529-553.
- Csirke, J. 1988.** Small shoaling pelagic fish stocks. In: *Fish population Dynamics (second Edition)* J. A. Guland (ed) John Willey and sons Ltd. 271-302.
- Chavira-Niño, M. A. 2005.** Morfología microscopía de la gónada de la sardina monterrey *Sardinops sagax* (Pises: Clupeidae) con relación al índice gonadosomático en un ciclo anual. Tesis de Licenciatura. UABCS. 61pp
- Christiansen, H.S., S.R. Brodsky, y M.E. Cabrera. 1973.** Aplicación de una técnica histométrica en la determinación de la fecundidad en invertebrados marinos. *Phycis.* 32(84) 121-135.
- Delesse, M. A. 1847.** Procède mecanique pour determiner la composition des roches. *Comptes rendus hebdomadaires des séances del'Academie des sciences, Paris* 25:544-545
- DeVlaming, V. 1983.** Oocyte development patterns and hormonal involvements. In: J.C. Rankinn, T.J. Pitcher and R.T. Duggan. *Control proces in Fish Physioly.* Croom Helm Ltd. 176-199.

- Dorph-Peretsen, K. A., J. R. Nyengaard and H. J. G. Gundersen. 2001.** Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. *J. microsc.* 204(3) 232-246.
- Emerson, L.S., M. Greer Walker and P.R. Witthames. 1990.** A stereological method for estimating fish fecundity. *J. Fish Biol.* 36, 721-730.
- Erickson, D. L., J. E. Hightower and G.D. Grossman. 1985.** The relative gonadal index: an alternative index for quantification of reproductive condition. *Comp. Biochem. Physiol.* 81(1): 117-120
- Estrada-Vargas, L. 2004.** Indicadores morfológicos de la fecundidad individual desde la vitelogénesis en la sardine monterrey *Sardinops sagax* en el Golfo de California, Mexico. Tesis. de Licenciatura. U.A.B.C.S. Mexico 53 pp
- FAO- Departamento de pesca. Código de conducta para la pesca responsable. 1995** (en línea), fecha de consulta 04/04/2008. <http://www.fao.org/DOCREP/005/v9878s/v9878s00.htm>
- Felix-Uraga, R. 2006.** Dinámica poblacional de la sardina del Pacifico *Sardinops sagax* (Jenyns 1842) (*Clupeiformes: Clupeidae*) en la costa Oeste de la Península de Baja California y Sur de California. Tesis Doctoral. CICIMAR-IPN. Mexico 75 pp.
- Grant, W.S. and R.W. Leslie 1996.** Late Pleistocene dispersal of Indian-Pacific populations in an ancient lineage of the genus *Sardinops*. *Mar. Biol.* 126: 133-142.
- Greer, W., P. R. Withames and I. Bautista de los Santos. 1994.** Is the fecundity of the Atlantic mackerel, (*Scomber scombrus*: Scombridae) determinate?. *Sarsia* 79: 13-26.
- Gundersen, H.J.G. and R. Østerby. 1981.** Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or "Do more less well". *J. Microsc.* 121, 65-73
- Gundersen, H.J.G. 1986.** Stereology of arbitrary particles: A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *J. Microsc.* 143,3-45.



- Gundersen, H.J.G., Bagger, P., Bendtsen, T.F., Evans, S.M., Krobo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J.R., Pakkenberg, B., Sorensen, F.B., Vesterby, A., and West, M.J. 1988.** The new stereological tools; Disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96: 857-881.
- Hardardottir, K., O.S. Kjesbu and G. Marteinsdottir. 2003.** Atresia in Iceland con (*Gadus morhua*, L.) prior to and during spawning. In *Modern Approaches to Assess Maturity and Fecundity of Warm and Cold Water Fish and Squids* (Kjesbu, O.S., Hunter, J.R. and Witthames, P.R., eds). *Fisken og Havet* 12, 51-55.
- Howard, C. V. and M. C. Reed. 1998.** Unbiased Stereology: Three-Dimensional measurement in microscopy. Bios Scientific Publishers. Springer-Verlag, N.Y. 246 pp.
- Hunter, J. R. And S. R. Goldberg. 1980.** Spawning incidence and the batch fecundity in Northern anchovy, *Engraulis mordax*. *Fish. Bull.* 77(3) 641-652.
- Hunter, J. R. and B. J. Macewicz 1980.** Sexual maturity, batch fecundity, spawning frequency and temporal pattern of spawning for the northern anchovy, *Engraulis mordax*, during the 1979 spawning season. *Calif. Coop. Ocean. Fish. Invest. Rep.* 21, 139-149.
- Hunter J.R. and R. Leong. 1981.** Spawning energetic of female northern anchovy *Engraulis nordax*. *Fish. Bull.* 79: 215-230.
- Hunter, J. R., N. Lo, and R. Leong. 1985.** Bath fecundity in multiple spawning fishes. In: An egg production method for estimating spawning biomass of pelagic fish: Application to the Northern anchovy. Reuben Lasker (Editor) NOAA technical report 36:67-77.
- Hunter, J. R., B. J. Macewicz, N. Ch. Lo, and C. A. Kimbell. 1992.** Fecundity spawning and maturity of females dover sole *Microstomus pacificus* with an evaluation of assumption and precision. *Fish. Bull.* 90(1): 101-128.
- Hunter, J. R. and R. Macewicz. 2003.** Improving the accuracy and precision of reproductive information used in fisheries. In: *Modern Approaches to Assess Maturity and Fecundity of Warm and Cold Water Fish and Squids* (Kjesbu, O.S., Hunter, J.R. and Witthames, P.R., eds). *Fisken og Havet* 12, 57-68.

- Howard, C.V. and M. G. Reed. 1998.** Unbiased stereology. Three-Dimensional Measurement in Microscopy. Bios Scientific Publishers Ltd. N. Y. 245pp.
- Jensen, E. B. and H. J. G. Gundersen. 1982** Stereological ratio estimation based on count from integral test systems. *J. Microsc.* 125, 51-66
- Katsukawa, T., H. Matsuda and Y. Matsumiya. 2002.** Population reproductive potential: Evaluation of long-term stock productivity. *Fish. Sci.* 68: 1106-1112.
- Kjesbu, O. S., J. R. Hunter and P. R. Witthames.(editors) 2003.** Introduction to: Modern approaches to assess maturity and Fecundity of warm and cold water fish and squids. Report of the working group. Bergen, Norway 4-7 september 2001, 130 pp.
- Korsbrekke, K. 2003.** Some aspects of estimating proportions mature and potential implications for stock predictions: In *Modern Approaches to Assess Maturity and Fecundity of Warm and Cold Water Fish and Squids* (Kjesbu, O.S., Hunter, J.R. and Witthames, P.R., eds). *Fisken og Havet* 12, 89-97.
- Lambert, J. D. G. 1970.** The ovary of the guppy, *Poecilia reticulata* the atretic follicle, a *Corpus atreticum* or a *Corpus luteum*. *Z. Zellforsch.* 107: 51-67
- LeClus, F. 1977.** A comparison of four methods used in fecundity determination in the pilchard *Sardinops ocellata*. *Fish Bull. S. Afr.* 9:11-15.
- Lluch-Belda, D., S. E. Lluch-Cota, D. B. Lluch-Cota y S. Hernandez-Vazquez. 2000.** La variabilidad oceanica interanual y su impacto sobre las pesquerias. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* 49:219-227.
- Martoja, R. y M. Martoja-Pierson, 1975.** Tecnicas de histología animal. Toray-Masson, S.A. Barcelona. 350 pp.
- MacGregor, J.S. 1957.** Fecundity of the Pacific sardine (*Sardinops sagax*). *U.S. Fish. Wildl. Serv. Fish Bull.* 57(121):427-449.
- Medina, A., F.J. Abascal, C. Megina and A. Garcia. 2002.** Stereological assessment of the reproductive status of female Atlantic northern bluefin tuna during migration to Mediterranean spawning grounds through the Strait of Gibraltar. *J. Fish Biol.* 60, 203-217.

- Moguel-Hernandez, I. 2007.** Fecundidad diaria específica de la sardine monterrey (*Sardinops sagax*) en Bahía Magdalena y en el Golfo de California. Tesis de Licenciatura. UABCS, Mexico, 69 pp
- Munro, A. D. 1990.,** Reproductive seasonality in teleosts: Environmental influences. A. D. Munro, A. P. Scott and T. J. Laam (Editors). CRC Press Inc. Florida, E.U. 2-11 p.
- Ochoa-Baez, R. I. 1998.** Estacionalidad reproductiva y producción ovárica de la anchoa europea, *Engraulis encrasicolus* (*Clupeiformes: Engraulidae*) en el mar Catalán. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Cataluña, Barcelona. 232 pp.
- Parker, K. 1980.** A direct method for estimating northern anchovy, *Engraulis mordax*, spawning biomass. Fish. Bull. 78(2):541-544.
- Parrish, R. H., D. L. Mallicoate and R.A. Klingbeil. 1986.** Age dependent fecundity, number of spawning per year, sex ratio and maturation stages in northern anchovy. Fish. Bull. 84: 503-517.
- Petersen, R. D., J. R. Nyengaard and H. J. G. Gundersen. 2001.** Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. J. Microsc. 204 (3) 232-246.
- Perezgomez, L. 2004.** Temporalidad en la reproducción y la fecundidad parcial de la sardine del Pacífico, *Sardinops caeruleus* (*Teleostei: Clupeidae*), en Bahía Magdalena, B.C.S. e Isla Cedros, B.C., México. Tesis Licenciatura. UABCS. 45pp.
- Picquelle, S. and G. Stauffer. 1985.** Parameter estimation for an egg production method of Northern anchovy biomass assessment. In: R. Lasker (ed.) An egg production method for estimating biomass of pelagic fish: application to the Northern anchovy. *Engraulis mordax*. NOAA Tech. Rep. NMFS 36: 7-15 p.
- Pitcher, T. J. 1995.** The impact of pelagic fish behavior on fisheries. Sci. Mar. 59 (3-4): 295-306.
- Plaza, G., G. Claramunt and G. Herrera. 2002.** An Intra-annual analysis of intermediate fecundity, batch fecundity and oocyte size of ripening ovaries of Pacific sardine *Sardinops sagax* in northern Chile. Fisheries Science 68: 95-103.
- Quinn, T. J. and Deriso, R. B. 1999.** Quantitative Fish Dynamics. Oxford

University Press, New Cork, 542 pp.

**Radovich, J. 1962.** Effects of the sardine spawning stock size and environment on year-class production. *Calif. Fish and Game*. 48(2): 123-140.

**Santander, H. J., J. Alheit and P. Smith. 1984.** Estimación de la biomasa de la población desovantes de la anchoveta peruana *Engraulis ringens* en 1981 por aplicación del "Método de producción de huevos". *Biol. Inst. Mar Perú-Callao* 8(6):213-250.

**Santalo, L. A. 1989.** Las secciones indiscretas. *Ciencia Hoy*. 1:(2), 7-10.

**Shaefer, K. M. 2003.** Estimation of the maturity and fecundity of tunas. . In *Modern Approaches to Assess Maturity and Fecundity of Warm and Cold Water Fish and Squids* (Kjesbu, O.S., Hunter, J.R. and Witthames, P.R., eds). *Fisken og Havet* 12, 79-87.

**Shea, S. M. 1962.** The Statistical Approach in Histology. *J. Theoret. Biol.* 3, 111-122.

**Simpson, A. C. 1951.** The fecundity of the platice. *Fish. Invest.* 2(57) 3-27

**Stacey, N. E. 1984.** Control of the timing of ovulation by exogenous and endogenous factors. In: G. W. Potts and R.J. Wootton (Eds.). *Fish Reproduction. Strategies and tactics*. 207-222 p.

**Sterio, D. C. 1984.** The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J. Microsc.* 134 (2) 127-136.

**Stoyan, D., Kendall, W. S. and Mecke, J. 1987.** *Stochastic Geometry and its Applications*. Academic Press Verlag, Berlin.

**Tanasishuk, R.W. and D.M. Ware. 1987.** Influence of interannual herring (*Clupea harengus pallasii*). *Can J. Fish. Aquat. Sci.* 44: 1485-1495.

**Thorsen, A. and O. S. Kjesbu. 2001.** A rapid method for estimation of oocyte size and potential fecundity in Atlantic cod using a computer-aided particle analysis system. *Journal of Sea Research* 46, 295-308.

**Thorsen, A., C. T. Marshall and O. S. Kjesbu. 2006.** Comparison of

various potential fecundity models for north-east Arctic cod *Gadus mohua*, L. using oocyte diameter as a standardizing factor. J. of Fish. Biol. 69, 1709-1730.

**Torres-Villegas, J. R. 1986.** Evaluación de *Sardinops sagax* por el método de producción de huevos, en Bahía Magdalena, B.C.S., México. Tesis de MC. CICIMAR-IPN. La paz, B.C.S., Mexico. 116p

**Torres-Villegas, J.R. y L. Perezgómez. 1988.** Variación de la fecundidad parcial de *Opisthonema libertate* (Gunter, 1866) (Teleostei: Clupeidae) de 1983 a 1985 en Bahía Magdalena, Baja California sur, Mexico. Inv. Pesq. 52(2): 193-206.

**Torres-Villegas, J. R., R. I. Ochoa-Bàez; L. Perezgómez-Alvarez y G. Garcia-Melgar 1995.** Comparison of seasonal variability in reproduction of Pacific sardine (*Sardinops sagax*) from Baja California Sur, México, in the years 1982-1992. Sci. Mar. 59(3-4): 255-264.

**Torres-Villegas, J. R. 1997.** La reproducción de la sardina monterrey (*Sardinops caeruleus*) en el Noroeste de México y su relación con el ambiente. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Cataluña. Barcelona. 338 pp.

**Torres-Villegas, J. R., R. I. Ochoa-Bàez; G. Garcia-Melgar L. Perezgómez y E. O. Rodríguez. 2000.** La Madurez final del folículo de la sardina (*Sardinops caeruleus*) y las estimaciones de fecundidad parcial. Mem. VII Congr. Soc. Ictiol. Mex. 21-24 de Nov. de 2000.

**Torres-Villegas, J. R. ., R. I. Ochoa-Bàez; y G. Garcia-Melgar 2002.** Manual del Programa de muestreadotes abordado. CICIMAR-IPN, Mexico. 40pp

**UN-2006.** CONVEMAR, (en línea) fecha de consulta 02/04/2008.  
[http://www.un.org/Depts/los/convention\\_agreements/texts/unclos/convemar\\_es.pdf](http://www.un.org/Depts/los/convention_agreements/texts/unclos/convemar_es.pdf)

**UN-2002.** Plan de acciones para el desarrollo sustentable Agenda 21. (en línea) Fecha de consulta 02/04/2008,  
<http://www.un.org/esa/sustdev/documents/agenda21/spanish/agenda21sptoc.htm>

- Wallace, R. A. and K. Selman 1981.** Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts *Amer. Zool.*, 21: 325-343.
- Weibel, E. R. 1979.** Stereological methods. Vol 1. Practical methods for biological morphometry. Academic Press.
- Weibel, E. R. and D. M. Gomez 1962.** A principle for counting tissue structures on random sections. *J. Appl. Physiol.* 17: 343-348.
- Weibel, E. R. G.S. Kristler and W.F. Scherle 1966.** Practical stereological Methods for morphometric cytology. *Journal of Cell Biology* 47, 259- 280.
- Witthames, P. R. 2003.** Methods to assess maturity and realized fecundity illustrated by studies on Dover sole *Solea solea*. In *Modern Approaches to Assess Maturity and Fecundity of Warm and Cold Water Fish and Squids* (Kjesbu, O.S., Hunter, J.R. and Witthames, P.R., eds). *Fisken og Havet* 12, 125-137.
- Zar, J.H. 1999.** *Biostatistical Analysis*. Fourth Edition. Prentice Hall. New Jersey. USA. p 351, 336-337