



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

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

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

Abstract

The first reproductive cycle of 50 females of the shortfin silverside, *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes) in culture conditions was analyzed. Ovarian developmental stages, gonadosomatic (GI) and hepatosomatic (HI) indexes were described. Histological description of the ovaries and quantification of estradiol serum levels (E₂) and 17α -hydroxy-4-pregnen-3-one (17-P₄) by radioimmuno assay were performed. Results showed a first reproductive season longer than six months. Females initiated spawning at the age of one year. Four ovarian maturation stages (I to IV) were determined during the spawning season and one (V) during the non-spawning season, the last one showed a non-defined pattern of development. The GI and HI indexes values indicate a positive linear relation to body-weight only during the reproductive season ($r^2 = 0.74$ and $r^2 = 0.86$, $P \leq 0.05$, respectively). Histological analysis of the ovaries indicated that the species correspond to the pattern described as group-synchronous with multiple spawnings. The follicular population showed reproductive activity during the first stages of maturation with a predominant population of pre-vitellogenic follicles. As the ovarian maturation increased, the presence of all the follicular developmental stages was observed, with a tendency of an increase of vitellogenic and mature follicles. The concentration of circulating sexual steroid hormones of estradiol (E₂) and 17α -hydroxy-4-pregnen-3-one (17-P₄) were high during stage I (2.5 ± 0.7 ng/mL and 2.4 ± 0.3 ng/mL for E₂ and 17-P₄, respectively); a decrease was observed during stage II, and the highest values were observed in stage IV (7.6 ± 2.1 ng/mL for E₂ and 1.8 ± 0.9 ng/mL for 17-P₄). The same pattern was observed during non-spawning season (ANOVA $P < 0.05$), these results are the first findings on the reproductive physiology of the shortfin silverside fish, suggesting an early steroidogenic activity in immature females. Furthermore, the species maintains its hormonal capacity during the post-spawning season, as it is supported by their follicular composition. The aforementioned will allow to have a better understanding of the mechanisms involved in their reproductive processes and to improve the mechanisms utilized to control their reproduction and for the production of eggs and larvae in culture conditions.

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

Resumen

Se analizó el primer ciclo reproductivo de 50 hembras de pez blanco, *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes), en condiciones de cultivo. Se describieron los estadios de desarrollo ovárico y los índices gonadosomático (IG) y hepatosomático (IH). Se realizó una descripción histológica de los ovarios y se midieron los niveles séricos del estradiol (E₂) y de la 17α -hidroxi-4-pregnen-3-ona (17-P₄) por radioinmunoanálisis. Los resultados mostraron una primera época reproductiva de más de seis meses. Las hembras iniciaron sus desoves a la edad de un año. Se identificaron cuatro estadios de maduración ovárica (estadios I al IV) en la época de desoves y uno más (V) en la época no reproductiva, este último no tuvo un patrón de desarrollo definido. Los valores de los índices IG e IH mostraron una relación lineal positiva con el peso corporal únicamente en la época reproductiva ($r^2 = 0.74$ y $r^2 = 0.86$, $P \leq 0.05$, respectivamente). El análisis histológico de los ovarios indicó que la especie se clasifica como sincrónica por grupos

Recibido el 1 de agosto de 2006 y aceptado el 18 de octubre de 2007.

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

**Planta Experimental de Producción Acuícola, Departamento de Hidrobiología y Departamento de Biología de la Reproducción, División de CBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Colonia Vicentina, 09340, México, D.F., Apartado postal, 55-535, Tel.: (01) 5804 6585 y (01) 5804 4708, Fax: (01) 58044740, correo electrónico: afjl@xanum.uam.mx y crr@xanum.uam.mx
Correspondencia: Dr. José Luis Arredondo Figueroa, Tel.: (01) 5804 6585; fax: (01) 5804 4738; correo electrónico: afjl@xanum.uam.mx

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

Palabras clave: PEZ BLANCO; *CHIROSTOMA HUMBOLDTIANUM*; DESARROLLO OVÁRICO; HORMONAS ESTEROIDES SEXUALES.

Introduction

Reproduction in teleosts fish is controlled by endogenous biological rhythms,¹ as in all vertebrates, being this a process that demands a physiological coordination, which is regulated by the hypothalamus-pituitary-gonadal axis and stimulated by environmental factors, such as photoperiod and temperature.² Association among gonadal development and serum levels of steroid hormones have proved to be an important tool to understand the endocrinal control in fish reproduction. It is known that in teleosts female fish, vitellogenesis and follicular maturation are regulated by GtH I and GtH II gonadotropins throughout steroid hormones secreted by follicular cells surrounding the oocyte. The main function of 17β -estradiol (E_2) is to stimulate the hepatic synthesis of the vitellogenine (VTG) and the lipoproteins, that are accumulated in the oocyte. Since maturation is induced by C21 steroids, such as $17,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ($17,20\beta-P_4$) and $17,20\beta,21$ -trihydroxy-4-pregnen-3-one ($17,20\beta,21-P_4$), these are called as maturation-induction hormones (MIH).³⁻⁹ Circulating estradiol influences the positive and negative regulation of the gonadotropin secretion by the hypophysis and on the synthesis and the hypothalamic release of the gonadotropin release hormone (GnRH).

Circulating E_2 levels decrease after ovarian growth and oocyte development are complete in the teleosts female fish. There is an increase in gonadotropin II (GtH II) that induces the steroidogenic process, synthesis and release of the MIH, when the female is ready for spawning.^{2,10-13}

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

Introducción

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

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

El pez blanco pertenece al género *Chirostoma* y son peces endémicos de la Meseta Central de México, donde sustentan la pesca ancestral en México. En condiciones naturales, el pez blanco de la especie *C. humboldtianum* presenta una amplia temporada reproductiva con desoves múltiples.^{14,15} Sin embargo, los

species which present culture problems, such as the shortfin silverside.¹⁴

The first reproductive cycle of the *C. humboldtianum* female under culture conditions, ovarian maturation stages and changes in the follicular composition associated with circulating levels of 17 β -estradiol (E₂) and 17 α -hydroxy-4-pregnen-3-one (17-P₄) during spawning and reproductive rest seasons are presented here.

Material and methods

Reproductive fish

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

Ovarian development

Fifty female fish were caught from all the groups (30 in the reproductive season and 20 during the resting season). Ovarian-development study started with 10, 11 and 12-month-old fish. Females were anesthetized using benzocaine diluted with 1.6 % ethylic alcohol; TL and TW were recorded using an ictiometer graduated by millimeters, and a digital balance* with 0.0001 g accuracy, respectively. Ovarian color and appearance were recorded as well. Visceral space percentage (VSP) occupied by ovaries was assessed throughout the volumetric method.¹⁸ Using these values, gonadosomatic (GI) and hepatosomatic (HI) indexes were calculated, according to Tyler and Sumpter.¹⁹ Ovarian maturity stages were characterized in agreement with Solorzano,²⁰ who reported a classification for fish of the same genus.

conocimientos de su biología reproductiva son escasos. Particularmente en hembras, el conocimiento del proceso es fundamental para el control de la reproducción, sobre todo en especies que presentan dificultades en su cultivo, como los peces blancos.¹⁴

Aquí se presenta el primer ciclo reproductivo de hembras de *C. humboldtianum* criadas en cautiverio, los estadios de maduración ovárica y cambios en la composición folicular asociados con los niveles circulantes de 17 β -estradiol (E₂) y la 17 α -hidrox-4-pregnen-3-ona (17-P₄), durante las épocas de desove y de descanso reproductivo.

Material y métodos

Reproductores

Los progenitores de *C. humboldtianum* fueron inicialmente capturados de una población silvestre en la presa "Las Tasas", municipio de Jocotitlán, Estado de México, México, y mantenidos en condiciones de cultivo en las instalaciones de la Planta Experimental de Producción Acuícola (PEXPA), facilitadas por la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I). La población en estudio (F1) consistió en peces de sexo indistinto (n = 226). Los organismos fueron agrupados en tres cohortes de acuerdo con su edad: la cohorte 1, de 10 meses, n = 158 y con promedio de longitud total (LT) y peso (PT) de 94.2 $\pm$ 1.6 mm y 6.6 $\pm$ 1.6 g, respectivamente; cohorte 2, de 11 meses, n = 42 y con LT y PT de 116.8 $\pm$ 0.5 mm y 11.5 $\pm$ 1.9 g, respectivamente; cohorte 3, de 12 meses, n = 26 organismos, con LT y PT de 133.9 $\pm$ 2.3 mm y 19.6 $\pm$ 6.9 g, respectivamente. Cada cohorte fue cultivada por separado en un estanque de cuatro mil L de capacidad. Cada estanque contaba con un sistema cerrado de recirculación, la calidad del agua y estrategias de alimentación fueron las recomendadas por Mares y Morales¹⁶ y Blancas *et al.*^{14,17} El sexo de todos los peces fue determinado manualmente.

Desarrollo ovárico

Se capturaron 50 hembras de todos los cohortes (30 en la temporada reproductiva y 20 durante la época de descanso). El estudio del desarrollo ovárico inició con los peces de 10, 11 y 12 meses de edad. Las hembras se anestesiaron con benzocaína diluida en alcohol etílico al 1.6%, y sus pesos y longitudes totales se registraron con una balanza digital* de 0.1 g de precisión y un ictiómetro graduado en milímetros, respectivamente. Se extrajeron los ovarios y el hígado de cada hembra, y se pesaron en una balanza analítica*

*OHAUS, modelo GT 4800, Estados Unidos de América.

Follicular composition

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

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

Steroid hormones

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

Statistical analysis

Data base was captured using Excel software. A cor-

de 0.0001 g de precisión, de igual forma se registró el color y la apariencia de los ovarios. Se midió el porcentaje de espacio visceral (PEV) ocupado por los ovarios mediante el método volumétrico;¹⁸ con estos valores se calcularon los índices gonadosomático (IG) y hepatosomático (IH) de acuerdo con Tyler y Sumpter.¹⁹ Se caracterizaron los estadios de madurez ovárica de acuerdo con Solórzano,²⁰ quien indica una clasificación para peces del mismo género.

Composición folicular

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

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

Hormonas esteroides

Se analizaron 35 muestras de suero. A causa del poco volumen recolectado, nueve de ellas fueron muestras compuestas de sueros de hembras que presentaron el mismo estadio de madurez ovárica y composición folicular. Las hormonas esteroides se evaluaron mediante la técnica de radioinmunoanálisis (RIA), basada en los principios metodológicos descritos por Herrera *et al.*²⁴ y Carolsfeld *et al.*,²⁵ empleando H³ y anticuerpos altamente específicos. La sangre fue recolectada

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

**Paraplast-Merk, Estados Unidos de América.

***Modelo HM 315, Leica, Walldorf, Alemania.

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

relation analysis (CA) was done to verify GI and HI correspondences regarding female total weight in the reproductive and resting seasons.²⁶ A data exploratory analysis (DEA) with box plots was used,²⁷ in order to assess hormone level behaviors between each other and during both seasons.²⁸ A non-parametric, one way ANOVA test was used to determine significant differences among the hormonal levels found according to each developmental stage.

Results

First female reproductive season

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

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

Ovarian development

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

Minimum and maximum GI and HI values during the reproductive season were 0.2 to 7.1 and 0.9 to 2.9, respectively, and values during the non-reproductive season were 0.3 to 3.5 and 1.2 to 2.2, respectively. Both indexes showed a positive relation with body weight during the reproductive season in the CA ($r^2 = 0.74$, $P \leq 0.05$ and $r^2 = 0.89$, $P \leq 0.05$, for GI and HI, respectively), but not during the resting season ($r^2 = 0.3$, $P \leq 0.05$ and $r^2 = 0.17$, $P \leq 0.05$).

Follicular composition

Histological analysis showed that gonads in the short-fin silverside females had follicles in all of the developmental stages, pre-vitelline (PF, SF and TF) as well as

mediante punción cardiaca y se obtuvo el suero por centrifugación (15 min a 805 g y 4°C). Las muestras de suero se purificaron con filtros* y se obtuvo 80% de recuperación de cada esteroide. Cada muestra de suero purificada se recuperó en dos fracciones: una con etanol y la otra con agua destilada, el alcohol fue evaporado para después unir ambas fracciones (1 mL). Finalmente, el suero se diluyó a un volumen final de 2 mL con Gel-PBS (0.2 M, 17.6 g de NaCl y 2.0 g de gelatina/L). Las curvas estándar fueron sensibilizadas hasta 5 pg/mL. Se tomaron alícuotas de 400 µL por duplicado para evaluar con RIA y por separado el E₂ y la 17-P₄. El análisis se realizó conforme a cada estadio de madurez ovárica y composición folicular para ambas épocas.

Análisis estadístico

La base de datos fue capturada en el software Excel. Se realizó un análisis de correlación (AC) para verificar las correspondencias del IG e IH con respecto al peso total de la hembra para las épocas reproductiva y de descanso.²⁶ Se empleó un análisis exploratorio de datos (AED) de diagrama de cajas,²⁷ para conocer la conducta de los niveles hormonales entre sí y en ambas temporadas.²⁸ Se utilizó una prueba de ANDEVA de una sola vía no paramétrica para determinar diferencias significativas entre los niveles hormonales encontrados conforme a cada estadio de desarrollo.

Resultados

Primera época reproductiva en las hembras

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

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

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

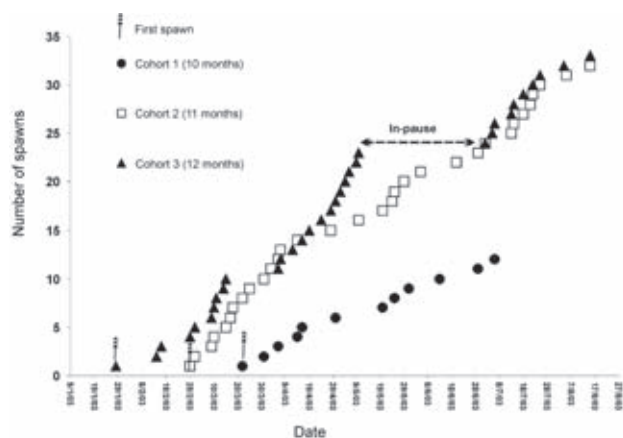


Figura 1: Etapas de desove de cada cohorte durante 2003.

Figure 1: Spawning events of each cohort during 2003.

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

Sexual steroid hormones

Circulating levels of the E₂ and 17-P₄ steroid hormones detected in the shortfin silverside females, varied between 0.56 to 9.68 ng/mL and 0.53 to 2.55 ng/mL, respectively. Figure 3 depicts the mean hormonal levels, grouped according to ovarian maturation stages. Important circulating levels were observed in immature females (stage I) during the spawning season, reaching 2.5 ± 0.7 ng/mL of E₂ and 2.4 ± 0.3 ng/mL of 17-P₄. Hormonal levels during stage II were 1.7 ± 0.2 ng/mL of E₂ and 0.9 ± 0.2 ng/mL of 17-P₄ an increase was seen again in stage III with 2.8 ± 0.6 ng/mL levels of E₂ and 1.4 ± 0.5 ng/mL of 17-P₄. High E₂ levels were detected in stage IV (7.5 ± 2.1 ng/mL), while 17-P₄ levels were similar to those in stage II (1.8 ± 0.9 ng/mL).

During the non-reproductive season, ovaries were in stage V (post-spawning). However, mean of E₂ and 17-P₄ levels detected in females with an ovarian stage similar to stage I were 1.9 ± 1.4 ng/mL and 1.9 ± 0.5 ng/mL, respectively. These values decreased to 1.5 ± 0.6

ron discreta pero constante actividad (menor número de desoves).

Desarrollo ovárico

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

Los valores de IG e IH máximos y mínimos fueron 0.2 a 7.1 y 0.9 a 2.9, respectivamente, durante la época reproductiva, y de 0.3 a 3.5 y 1.2 a 2.2 en las hembras en la temporada no reproductiva, respectivamente. Ambos índices mostraron durante la época reproductiva una relación positiva con el peso corporal en el AC ($r^2 = 0.74$, $P \leq 0.05$ y $r^2 = 0.89$, $P \leq 0.05$, para el IG e IH, respectivamente), no así en la época de descanso ($r^2 = 0.3$, $P \leq 0.05$ y $r^2 = 0.17$, $P \leq 0.05$).

Composición folicular

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

Hormonas esteroides sexuales

Los niveles circulantes de hormonas esteroides de E₂ y de la 17-P₄ detectados en las hembras del pez blanco,

Cuadro1

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS ESTADIOS DE MADURACIÓN OVÁRICA EN EL PEZ BLANCO, *C. humboldtianum*

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

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

VSP = Visceral Space Percentage, GI = Gonadosomatic Index.

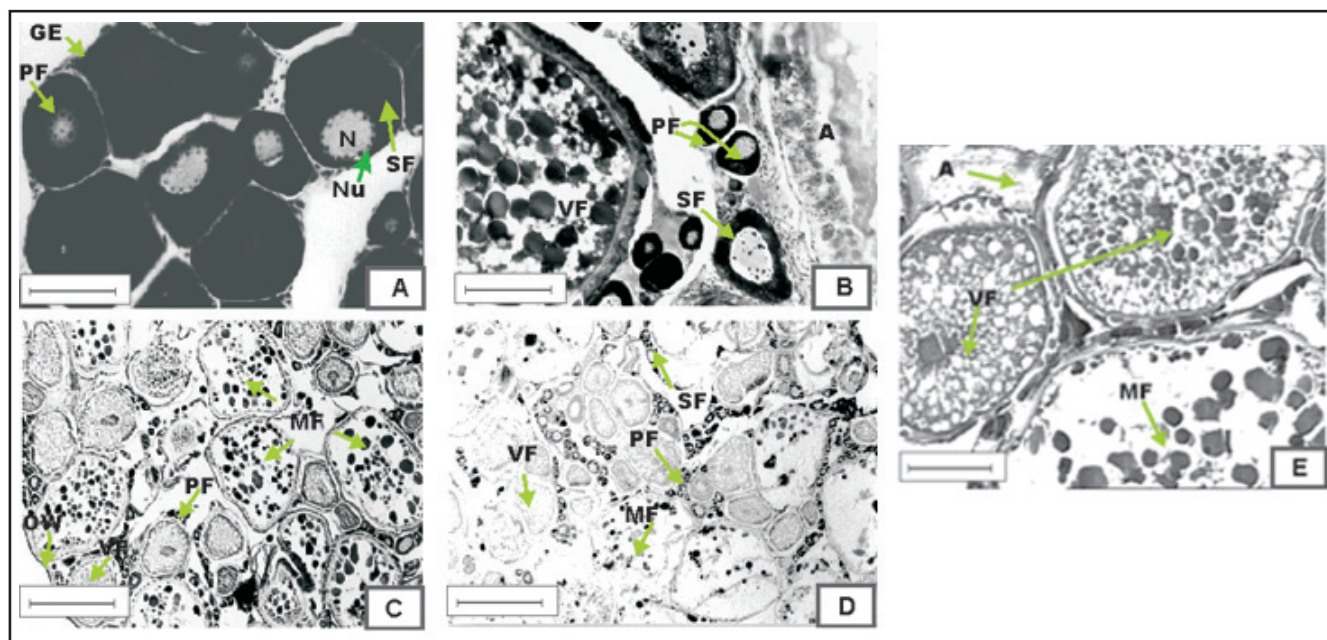


Figura 2: Cortes histológicos de los estadios de maduración ovárica observados en *C. humboldtianum* (H-E). A) Estadio I, inmaduro (500 X), Barra = 38 μ : EG = Epitelio germinal, FP = Folículo primario; N = Núcleo; Nu = Nucleolos; FS = Folículo secundario; B) Estadio II, maduración temprana (200 X), Barra = 89 μ : A = Atresia, FV = Folículos vitelinos; C) Estadio III, crecimiento ovárico (32 X), Barra = 600 μ : PO = Pared del ovario, FM = Folículos Maduros; D) Estadio IV, en desove (32 X), Barra = 600 μ y E) Estadio V posdesove (200 X), Barra = 89 μ .

Figure 2: Histological cuts of the ovarian maturation stages observed in *C. humboldtianum* (H-E). A). Stage I, immature (500 X), Bar = 38 μ : GE = Germinal epithelium, PF = Primary follicles; N = Nucleus; Nu = Nucleolus; SF = Secondary follicles; B) Stage II, early maturation (200 X), Bar = 89 μ : A = Athresia, VF = Vitellogenic follicles; C) Stage III, ovarian growth (32 X), Bar = 600 μ : OW = Ovarian wall, MF = Mature follicles; D) Stage IV, spawning (32 X) Bar = 600 μ : and E) Stage V, post-spawning (200 X), Bar = 89 μ .

ng/mL of E₂ and 1.3 ± 0.5 ng/mL of 17-P₄ in females with a stage similar to that in stage II, and increased again in females with a stage similar to stage III (1.9 ± 0.0 ng/mL of E₂ and 1.6 ± 0.0 ng/mL of 17-P₄). No significant difference was detected ($P \leq 0.05$) among hormonal levels when females with similar developmental stages were compared between seasons.

The follicular compositions of the four maturation stages described during the spawning season are contrasted, associated with the circulating E₂ and 17-P₄ levels in Figure 4. Immature females in stage I exclusively showed pre-vitelline follicles, mainly primary and secondary ones (40% and 43%, respectively), which were related to hormonal levels higher than 2

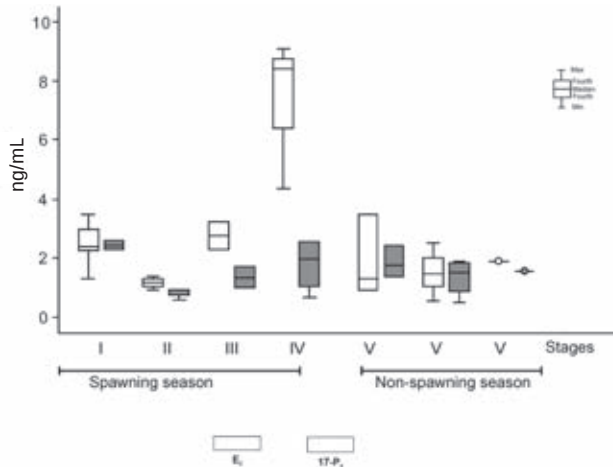


Figura 3: Niveles cambiantes del E₂ y de la 17-P₄ observados en cada estadio de maduración durante la temporada de desoves y de no actividad reproductiva.

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

fluctuaron entre 0.56 a 9.68 ng/mL y de 0.53 a 2.55 ng/mL, respectivamente. La Figura 3 muestra los niveles hormonales promedio, agrupados de acuerdo con los estadios de maduración ovárica. Se detectaron niveles circulantes importantes en hembras inmaduras (estadio I) durante la temporada de desoves, alcanzando 2.5 ± 0.7 ng/mL de E₂ y 2.4 ± 0.3 ng/mL de 17-P₄; se detectaron niveles en el estadio II de 1.7 ± 0.2 ng/mL de E₂ y 0.9 ± 0.2 ng/mL de 17-P₄; y nuevamente en el estadio III, se observó incremento con niveles de 2.8 ± 0.6 ng/mL de E₂ y 1.4 ± 0.5 ng/mL de 17-P₄. Los valores altos de E₂ se detectaron en el estadio IV (7.5 ± 2.1 ng/mL), mientras que los niveles de 17-P₄ fueron similares al estadio II (1.8 ± 0.9 ng/mL).

Durante la temporada no reproductiva, los ovarios estaban en el estadio V (posdesove). Sin embargo, los niveles promedio detectados de E₂ y 17-P₄ en las hembras con estado ovárico similar al del estadio I fueron de 1.9 ± 1.4 ng/mL y 1.9 ± 0.5 ng/mL, respectivamente. Estos valores disminuyeron a 1.5 ± 0.6 ng/mL de E₂ y 1.3 ± 0.5 ng/mL de 17-P₄ en hembras con un estadio similar al de la etapa II, e incrementando de nuevo en las hembras con estado similar al estadio III (1.9 ± 0.0 ng/mL de E₂ y 1.6 ± 0.0 ng/mL de 17-P₄). No se detectó diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre los valores de niveles hormonales comparando hembras con estadios similares de desarrollo entre ambas temporadas.

En la Figura 4 se contrasta la composición folicular de los cuatro estadios de maduración descritos durante la época de desoves, asociados con los niveles circulantes de E₂ y 17-P₄. Las hembras inmaduras en el estadio I mostraron exclusivamente folículos pre-

Cuadro 2

VALORES PROMEDIO Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR ($\pm$) DE LOS PORCENTAJES DE CADA ESTADO DE MADUREZ DURANTE LA ÉPOCA DE DESOVE EL PEZ BLANCO, *C. humboldtianum*

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

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

N = Sample Size; PF= Primary Follicles; SF = Secondary Follicles; TF = Tertiary Follicles; VF = Vitellogenic Follicles; MF= Mature Follicles.

ng/mL for both hormones. Females with gonads in stage II showed a high number of pre-vitelline follicles and the first vitelline and mature ones appeared (7% and 3%, respectively), along with a decrease in hormonal levels. Females in stage III were characterized by the presence of primary follicles (42%), increase in vitelline and mature ones (15% and 6%, respectively), and according to the increased hormonal levels observed (E_2 and $17-P_4$). Finally, females in stage IV showed follicles in all stages, with a significant presence of vitelline and mature ones (21% and 11%), which agreed with the high hormonal levels, especially E_2 .

Discussion

Reproductive season in the shortfin silverside fish is wide and varies depending on the habitat and species.^{14,15,17} Studies on *C. humboldtianum* fishing biology point out that the reproductive season in wild populations lasts six months, with some months of intense activity; while two spawning seasons are recorded in other shortfin silverside species.¹⁵ Data found on this fish under captivity conditions during the last four years, showed that the reproductive season includes

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

Discusión

La época reproductiva del pez blanco es amplia y varía dependiendo del hábitat y de la especie.^{14,15,17} Los estudios de biología pesquera con *C. humboldtianum*

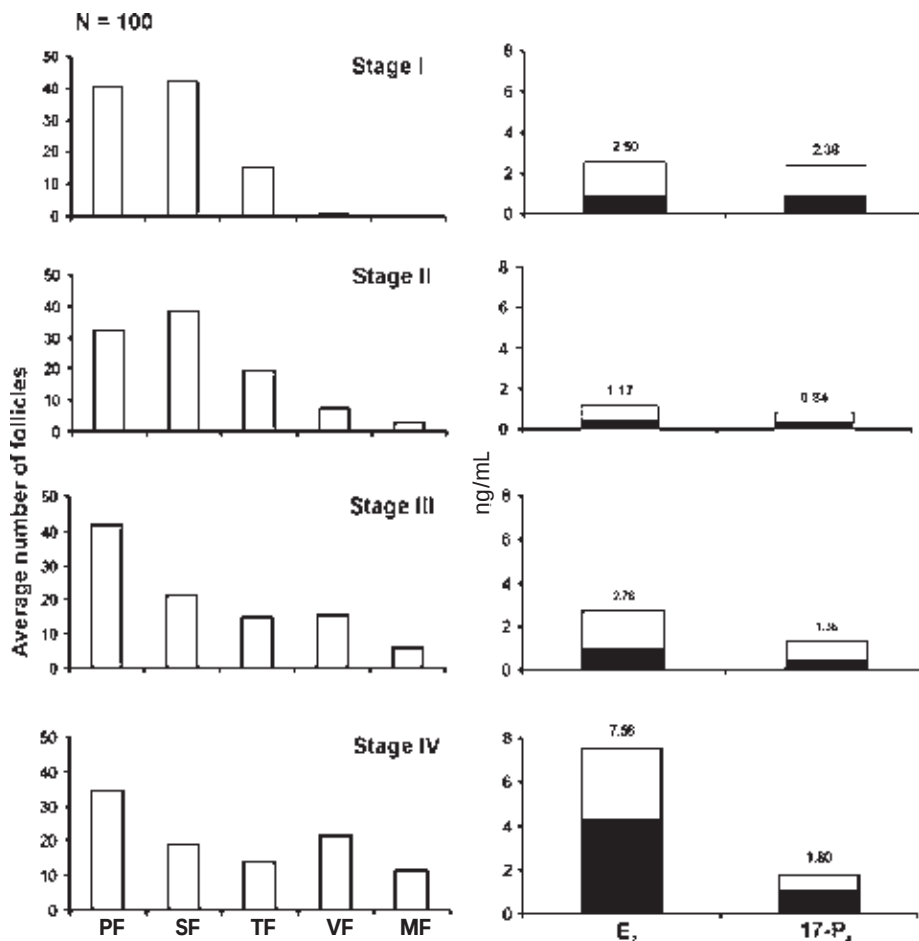


Figura 4: Frecuencia (%) de las distintas etapas de desarrollo folicular y concentración de hormonas E_2 y $17-P_4$ en los diferentes estados de maduración ovárica. PF = Folículos primarios; SF = Folículos secundarios; TF = Folículos terciarios; VF = Folículos vitelinos; MF = Folículos maduros.

Figure 4: Frequency (%) of the follicular development stages and hormones concentration of E_2 and $17-P_4$ in the different ovarian maturation stages. PF = Primary follicles; SF = Secondary follicles; TF = Tertiary follicles; VF = Vitellogenic follicles; MF = Mature follicles.

only one spawning season along the year. This season starts during the first months of the year (with a gradual temperature and photoperiod increase) and prolongs until July and August. During this time, the females have several spawnings and a huge metabolic waste.^{14,17} Older and bigger females had a constant activity through out the reproductive season, while the younger ones started spawning when the rest of the population had a decreased activity (Figure 1).

In these species, age of first reproduction also varies according to habitat and environmental conditions.^{14,15} Reports regarding the issue mention that females reach sexual maturity when an 81 to 130 mm total length is achieved.²⁹ It was found in this study that the mean length in which females start reproducing is 133.9 ± 2.3 mm, that corresponds to one-year-old fish.

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

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

C. humboldtianum females showed pre-vitelline and vitelline follicles throughout the different stages of ovarian development; which explains the reproductive strategy of this species and concurs with other histological reports.^{29,34} However, the classification of gonadal maturity proposed in this research (Table 1), is backed up by histological observations and shows the gradual process of the first gonadal maturity, in disagreement with other studies. Constant recruitment of primary follicles (Table 2) points out the presence of "oogonia banks" during all the period of sexual life; as it occurs in teleosts fish and some amphibians.³⁵ Constant spawning denotes the pres-

indican que la época reproductiva en poblaciones silvestres es de seis meses, con algunos meses de intensa actividad, mientras que para otras especies de "peces blancos" se registran dos épocas de desoves.¹⁵ Los datos encontrados con estos peces en cautiverio en los últimos cuatro años mostraron que la temporada reproductiva está representada sólo por una época de desoves durante el año, la cual da inicio en los primeros meses del propio año (con incremento gradual de temperatura y fotoperiodo) y se extiende hasta julio y agosto; en ella, la hembra tiene varios desoves y gran desgaste metabólico.^{14,17} Como se indica en la Figura 1, durante la temporada reproductiva, las hembras de mayor edad y tamaño tuvieron constante actividad, mientras que las de menor edad inician sus desoves cuando el resto de la población la disminuye.

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

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

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

Las hembras de *C. humboldtianum* mostraron folí-

ence of females with different follicular composition along the reproductive season, due to the fact that, when mature oocytes are released, other follicles continue the oogenesis process, which is characteristic of multiple-group-synchronous fish.¹⁹ According to histological data and spawning pattern, the description done by Pankhurst³⁶ on this species should be considered as group-synchronous with multiple spawning, despite the GI values seen in this study. Therefore, in order to define the pattern of the reproductive model and ovarian development, it is suggested that the use of a histological analysis is necessary, instead of basing it exclusively on GI.

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

The hormonal levels (E_2 and 17-P₄) found in *C. humboldtianum* seem to support the previous affirmation. It was found that hormonal levels, as well as follicular composition, were similar between the spawning and resting seasons when females with similar ovarian stages were compared (ANOVA $P < 0.05$). The previous information suggests that ovaries keep their steroidogenic capacity in the non-spawning season throughout their follicular population. However, females do not reach the maximum maturity stage, because of the huge metabolic waste provoked by the spawning season and the changing conditions in natural environments regarding temperature and photoperiod. Therefore, following hormonal levels since juvenile stages towards the end of their reproductive life, might be an interesting field for future investigations.

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

Several evidences in fish endocrinology emphasize the roll of the teca cells in the 17-P₄ synthesis and the following participation of the granulose cells to transform it into 17,20 β -P₄, and 17,20 β , 21-P₄, while 17-P₄ is transformed to E_2 by the testosterone via through another metabolic way.^{10,37,38} Follicular population for

culos previtelinos y vitelinos durante los diferentes estadios de desarrollo ovárico. Lo anterior explica la estrategia reproductiva de la especie, y coincide con otros informes histológicos.^{29,34} Sin embargo, a diferencia de otros estudios, la clasificación de los estadios de maduración gonadal propuesta en esta investigación (Cuadro 1), se encuentra respaldada por las observaciones histológicas y muestra el proceso gradual de la primera madurez gonadal. El constante reclutamiento de los folículos primarios (Cuadro 2) indica la presencia de "bancos de ovogonias" durante todo el periodo de vida sexual, característica propia de los peces teleósteos y de algunos anfibios.³⁵ Los desoves constantes indican presencia de hembras con distinta composición folicular a lo largo de la temporada reproductiva, en virtud de que al ser liberados los ovocitos maduros, otros folículos continúan con el proceso de ovogénesis, que es característico de los desovadores de tipo sincrónico por grupos.¹⁹ De acuerdo con los datos histológicos y patrón de desoves, la descripción que hace Pankhurst³⁶ de esta especie debe ser considerada como sincrónica por grupos múltiples, a pesar de los valores de IG presentados en este estudio. Por lo tanto, para definir el patrón del modelo reproductivo y desarrollo ovárico, se sugiere emplear necesariamente un análisis histológico y no únicamente basarse en el IG.

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

Los niveles hormonales de E_2 y de la 17-P₄ encontrados en *C. humboldtianum*, parecen apoyar lo anterior. Al comparar a las hembras con estados similares de desarrollo ovárico, entre la época de desoves y la de descanso reproductivo; se encontró, al igual que con la composición folicular, que los niveles hormonales eran similares para ambas temporadas (ANDEVA $P < 0.05$), lo que sugiere que en la temporada de no desoves, los ovarios mantienen su capacidad esteroidogénica, la cual es sostenida por su población folicular. Sin embargo, las hembras no alcanzan su máximo estado de madurez, debido probablemente al gran gasto metabólico que les infringió la temporada de

females in stage I was characterized in this study by the absence of vitelline and mature follicles, as well as by the presence of primary and secondary ones, which do not show a complete development of the follicular walls; nonetheless, they do present significant hormonal levels.

Nakamura and Nagahama³⁹ studies on cichlids and salmonid species concur with the reported here. They suggest an early hormonal activity as a necessary requirement to start the gonadal differentiation process; furthermore, they showed that steroid producing cells initially appear at the same time as gonadal differentiation occurs in tilapia (*Oreochromis niloticus*) and salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). The aromatizing activity in steroid producing cells in mature ovaries from *Oreochromis niloticus* has been evident by using immunohistochemical procedures.⁵ Recently, Grier⁴⁰ reported that oogonia that are still in the germinal epithelium, are already surrounded by pre-follicular cells, visible only by electronic microscopy since the beginning of the oogenesis. This kind of evidence may explain the levels found in immature gonads in the present study and support the theory of an early aromatizing activity in the incipient follicular structures. Perez⁴¹ reported lately about the presence of significant estradiol levels in females which ovaries also showed mainly pre-vitelline follicles in a neotropical Mexican species (*Petenia splendida*). Furthermore, there is evidence about the production or extragonadal conversion of steroid hormones in brain cells, what implies an important roll in the control of gonadal development.⁴² This situation suggests a question posterior to the sexual differentiation process: when does the gonadal steroid synthesis begins in the shortfin silverside fish?

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

This paper represents the first contribution to the gonadal anatomic-functional process in the shortfin silverside fish (*C. humboldtianum*) during its first reproductive cycle. It also supports the hypothesis of an early activity in the gonadal steroid synthesis, as well as the maintenance of the steroidogenic capac-

desoves y los cambios en las condiciones ambientales naturales de temperatura y fotoperiodo. Por lo tanto, el seguimiento de los niveles hormonales desde etapas juveniles hasta el final de su vida reproductiva pudiera ser un campo muy interesante para futuras investigaciones.

Los niveles hormonales encontrados en este estudio indican actividad esteroidogénica temprana (estadio I), que difiere de otros hallazgos, en los cuales se sostiene que la máxima capacidad esteroidogénica que se debe a las capas foliculares bien desarrolladas, propias de folículos vitelinos y maduros que caracterizan a las gónadas maduras.^{8-10,37,38}

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

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

ity along the non-spawning season, based on the follicular population as a previous stage to the next reproductive season, or to an environmental stimulus favorable for reproduction.

Acknowledgements

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

Referencias

1. Munro AD. General introduction. In: Munro AD, Scott AD, Lam TJ, editors. Reproductive seasonality in Teleosts environmental influences. Boca Raton Florida: CRC Press, 1990:1-11.
2. Redding JM, Patiño R. Reproductive physiology. In: Evans DH, editor. The physiology of fishes. Boca Raton Florida: CRC Press, 1993:503-534.
3. Young G, Kagawa H, Nagahama Y. Secretion of aromatizable $\Delta 4$ androgens by thecal layers during estradiol-17 β production by ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) *in vitro*. *Biom Res* 1982; 3:659-667.
4. Kagawa H, Young G, Nagahama Y. *In vitro* estradiol-17 beta and testosterone production by ovarian follicles of the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol* 1984; 54:139-143.
5. Kobayashi M, Aida K, Hanya U. Hormone changes during the ovulatory cycle in goldfish. *Gen Comp Endocrinol* 1988; 69:301-339.
6. Smith JS, Thomas P. Binding characteristics of the hepatic estrogen receptor of the spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*. *Gen Comp Endocrinol* 1990; 77:29-42.
7. Yoshikuni M, Nagahama Y. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Bull Inst Zool Acad Sin Mon* 1991; 16:139-172.
8. Nagahama Y. 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one a maturation-inducing hormone in fish oocytes: Mechanisms of synthesis and action. *Steroids* 1997; 62:190-196.
9. Devlin HR, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 2002; 208:191-364.
10. Nagahama Y. Endocrine control of oocyte maturation. In: Norris DO, Jones RE, editors. Hormones and reproduction in fishes, amphibians and reptile. Nueva York: Plenum, 1987:171-201.
11. Swanson P, Suzuki K, Kawauchi H, Dickhoff WW. Isolation and characterization of two Coho salmon gonadotropins GTH I and GTH II. *Biol Reprod* 1991; 44, 29-38.
12. Thomas, P. Hormonal control of final oocyte maturation in sciaenid fishes. In: Davey KG, Peter RE, Tobe SS, editors. Perspectives in comparative Endocrinology.

control de desarrollo gonadal,⁴² situación que sugiere una interrogante posterior al proceso de diferenciación sexual; ¿En qué momento inicia la síntesis de los esteroides gonadales en los “peces blancos”?

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

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

Agradecimientos

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

logy. Ottawa Canada: National Research Council of Canada, 1994:619-625.

13. Patiño R. Manipulations of the reproductive system of fishes by means of exogenous chemicals. *Prog Fish-Cult* 1997; 59:118-128.
14. Blancas-Arroyo G, Figueroa-Lucero G, Barriga-Sosa I, Arredondo-Figueroa JL. Effects of an artificial photothermal cycle on the reproduction of shortfin silverside, *Chirostoma humboldtianum*, Valenciennes, 1835 (Pisces: Atherinopsidae). *Aquaculture* 2004; 241: 575-585.
15. Paulo MP, Figueroa LG, Soria BM. Peces dulceacuícolas mexicanos XIX *Chirostoma humboldtianum* (Atheriniformes: Atherinopsidae). *Zool Inf* 2000;3:59-74.
16. Mares BG, Morales PJJ. Contribución al estudio del cultivo de pescado blanco *Chirostoma estor estor* en el centro Regional de Investigación Pesquera de Pátzcuaro,

- Michoacán. En: Rojas CP, Fuentes CD, editores. Historia y avances del cultivo de pescado blanco. México DF; Instituto Nacional de la Pesca, 2003:43-154.
17. Blancas-Arroyo G, Figueroa-Lucero G, Barriga-Sosa I, Arredondo-Figueroa JL. Primeras experiencias sobre el manejo de reproductores de Pez Blanco (*Chirostoma humboldtianum* Valenciennes, 1935) bajo condiciones controladas. Memorias del II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura CIVA 2003; 2003 agosto-febrero 2004; Universidad de Zaragoza, España: Universidad de Zaragoza, Agosto 2003:30-42. Disponible en: <http://www.revistaaquatic.com/civa2003/coms/listado.asp?cod=38>
 18. Rodríguez GM. Técnicas de evaluación cuantitativa de la madurez gonádica en peces. México DF: AGT, 1992.
 19. Tyler CR, Sumpter, LP. Oocyte growth and development in teleosts. Rev Fish Biol Fisheries 1996; 6:287-318.
 20. Solórzano PA. Contribución al conocimiento de la biología del charal prieto (*Chirostoma bartoni*, Jordán y Evermann, 1896) del lago de Pátzcuaro, Michoacán. México DF: Secretaría de Pesca, 1961.
 21. Uriá GE, Moncayo LME, Garibay GR. Desarrollo y madurez testicular del charal *Chirostoma humboldtianum* (Pisces: Atherinidae), del embalse Huapango, Estado de México. Hidrobiológica 1998; 8(Supl 1):9-18.
 22. Lee GL. Manual of histological staining methods of Armed Forces Institute of Pathology. 3rd ed. New York; McGraw-Hill Book Co, 1974.
 23. Wallace RA, Selman K. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. J Electron Microscop Techn 1990; 16:175-201.
 24. Herrera DMR, Luna MM, Romero RC. Obtención de anticuerpos con la progesterona y estradiol, estandarización del radioinmunoanálisis y validación en sueros de rumiantes. Vet Méx 1993; 24:223-230.
 25. Carolsfeld J, Scott AP, Collins PM, Sherwood NM. Reproductive steroids during maturation in a primitive Teleost, the Pacific Herring (*Clupea harengus pallasii*). Gen Comp Endocrinol 1996; 103:331-348.
 26. Zar JH. Biostatistical Analysis. Nueva Jersey USA: Prentice-Hall Englewood Cliffs, 1999.
 27. StataCorp. Stata statistical software (computer program); Release 8.0., Texas (USA): College Station, 2003.
 28. Salgado-Ugarte IH. El análisis exploratorio de datos biológicos. Fundamentos y aplicaciones. México DF: Facultad de Estudios Superiores- Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, 1992.
 29. Cárdenas RR. Cultivo de pez blanco *Chirostoma humboldtianum*. Consideraciones para su producción. In: Rojas CP, Fuentes CD, editores. Historia y avances del cultivo de pescado blanco. México DF; Instituto Nacional de la Pesca, 2003:191-210.
 30. Tyler CR. Vitellogenesis in salmonids. In: Scott AP, Sumpter JP, Kime DE, Rolfe L, editors. Reproductive Physiology of Fish. United Kingdom England: Sheffield University Press, 1991:295-299.
 31. Carnevali O, Mosconi G, Cambi A, Ridolfi S, Zanuy S, Polzonetti-Magni AM. Changes of lysosomal enzyme activities in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) eggs and developing embryos. Aquaculture 2001; 202:249-256.
 32. Zou JJ, Trudeau VL, Cui Z, Brechin J, Mackenzie K, Zhu Z *et al.* Estradiol stimulates growth hormone production in female goldfish. Gen Comp Endocrinol 1997; 106:102-112.
 33. Kwon HC. Effects of estradiol and pituitary hormones on *in vitro* vitellogenin synthesis in the eel, *Anguilla japonica*. J Korean Fish Soc 1997;30:282-290.
 34. Moncayo ER, Escalona GC, Segura GV. Los peces blancos del Lago de Chapala. Características Generales. En: Rojas CP, Fuentes CD, editores. Historia y avances del cultivo de pescado blanco. México DF; Instituto Nacional de la Pesca, 2003:51-78.
 35. Tokarz RR. Oogonial proliferation, oogenesis, and folliculogenesis in onmammalian vertebrates. In: Takashima F, Hibiya T, editors. An atlas of fish histology. Normal and pathological features. Tokyo Japan: Gustav Fischer Verlag, 1978.
 36. Pankhurst NW. Reproduction. In: Black KD, Pickering AD, editors. Biology of Farmed Fish. Florida USA: Sheffield Academic Press, 1998:1-18.
 37. Fostier A, Jalabert B, Billard R, Breton B, Zohar Y. The gonadal steroids. In: Hoar AWS, Randall DJ, Donaldson EM, editors. Fish Physiology. Orlando Florida: Academic Press, 1983:277-372.
 38. Lee WK, Yang SW. Relationship between ovarian development and serum levels of gonadal steroid hormones, and induction of oocyte maturation and ovulation in the cultured females Korean spotted sea bass *Lateolabrax maculatus* (Jeom-nong-eo). Aquaculture 2002; 207:169-183.
 39. Nakamura M, Nagahama Y. Ultrastructural study on the differentiation and development of steroid-producing cells during ovarian differentiation in the amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*. Aquaculture 1993; 112:237-251.
 40. Grier H. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the Common Snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). J Morphol 2000; 243:265-281.
 41. Pérez VMH. Estudio histológico y endocrino de los ciclidos Neotropicales, Tenguayaca, Petenia splendida y la Mojarra Pinta, *Parachromis (Cichlasoma) managuensis* del Sudeste de México (tesis doctoral). México (D F): Universidad Autónoma Metropolitana, 2006.
 42. Callard GV, Manz L, Petro Z, Claiborne JB. Brain estrogen biosynthesis and estrogen conjugating system in the sculpin (*myoxocephalus*). Bull Mount Desert Island Biol Lab 1982; 22:41-43.
 43. Van Oordt PGWJ, Goos HJTH. The African catfish, *Clarias gariepinus*, a model for the study of reproductive endocrinology in Teleosts. Aquaculture 1987; 63:15-26.