



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



ESTEREOLOGÍA COMO ALTERNATIVA PARA
ESTIMAR LA FECUNDIDAD PARCIAL Y ATRESIA EN
LA SARDINA MONTERREY (*Sardinops sagax*) EN EL
PACÍFICO MEXICANO.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA
URIEL FERNANDO VALDEZ MONTIEL

LA PAZ, B.C.S., NOVIEMBRE DE 2017



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 16 del mes de Noviembre del 2017 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 titulada:

“ESTEREOLOGÍA COMO ALTERNATIVA PARA ESTIMAR LA FECUNDIDAD PARCIAL Y ATRESIA EN LA SARDINA MONTERREY (*Sardinops sagax*) EN EL PACÍFICO MEXICANO”

Presentada por el alumno:

VALDEZ
Apellido paterno

MONTIEL
materno

URIEL FERNANDO
nombre(s)

Con registro:

A	1	6	1	0	1	5
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

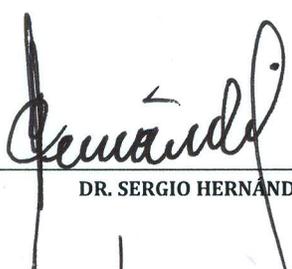
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

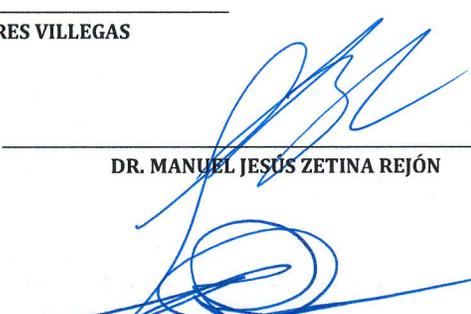
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

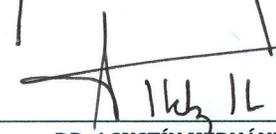
LA COMISION REVISORA

Director(a) de Tesis


DR. JULIÁN RENÉ TORRES VILLEGAS

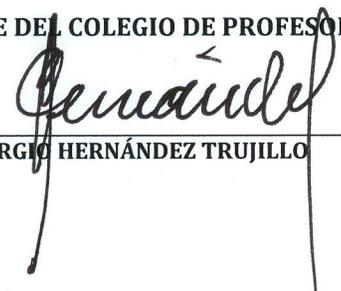

DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO


DR. MANUEL JESÚS ZETINA REJÓN


DR. AGUSTÍN HERNÁNDEZ HERRERA


DRA. ROSA ISABEL OCHOA BÁEZ

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO



I.P.N.
CICIMAR
DIRECCIÓN



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

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 23 del mes de Noviembre del año 2017

El (la) que suscribe BM. URIEL FERNANDO VALDEZ MONTIEL Alumno (a) del Programa

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro A161015 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DR. JULIÁN RENÉ TORRES VILLEGAS

y cede los derechos del trabajo titulado:

"ESTEREOLOGÍA COMO ALTERNATIVA PARA ESTIMAR LA FECUNDIDAD PARCIAL

Y ATRESIA EN LA SARDINA MONTERREY (*Sardinops sagax*) EN EL PACÍFICO MEXICANO"

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. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: urielfernandovaldez@gmail.com - jrtoresv@gmail.com

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

BMC. URIEL FERNANDO VALDEZ MONTIEL

Nombre y firma del alumno

Dedicatoria

A mi mamá Laura Elena Montiel Reyes por estar conmigo en todo momento a pesar de la distancia, gracias por todo tu amor y apoyo incondicional. Siempre he contado con tu apoyo este trabajo, también, es fruto de todos los sacrificios a lo largo de muchos años.

A la mujer que sirvió como inspiración y apoyo para terminar este pendiente Lizeth Daniela Trasviña Carrillo, Gracias por las horas y horas de prácticas para los seminarios y demás presentaciones. Por qué no pasas y presentas por mí? Al cabo ya conoces el trabajo de todo. Gracias haberme batallado con mis necesidades. Gracias Baby!!

A mis padres paceños, Selene Cota Lugo y Luis Eduardo Flores Acosta, que en todo momento han estado para apoyarme, y que en todo momento me han brindado su cariño y apoyo como uno más de sus hijos. A la necia de mi abuela paceña Rosalba Lugo Ruiz, por estar al pendiente de mi brindarme su cariño y apoyo en todos estos años.

Al grupo de investigación del CICIMAR-IPN por dejarme formar parte de este y otros proyectos más, por sus ejemplos y enseñanzas. Gracias Dr. Julián René Torres Villegas y Dra. Rosa Isabel Ochoa Báez

Al compa Wolf que es el único que sigue el cotorreo, el cual es indispensable para liberar la mente, desestresarse y poder avanzar con la cabeza fría. *“A él si lo dejan cotorrear y no le pega sus señora”* y también a los que les pega su señora. A la palomilla paceña y fauna de acompañamiento.

.

Agradecimientos.

A mí director de tesis: Dr. Julián René Torres Villegas por aclarar las dudas que fueron surgiendo durante la elaboración de este trabajo, por su asesoramiento científico y estímulo para seguir creciendo intelectualmente.

A los miembros del comité revisor de la presente tesis: Dr. Julián René Torres Villegas, Dra. Rosa Isabel Ochoa Báez, Dr. Sergio Hernández Trujillo, Dr. Agustín Hernández Herrera, Dr. Manuel Zétina Rejón y al Dr. Marcial Arellano Martínez por el seguimiento en los avances de tesis, sus comentarios y aportaciones para este trabajo.

A las empresas del sistema producto Pelágicos Menores de B.C.S A.C, A las empresas de la Asociación de Armadores de Pelágicos Menores de B. C. El Sauzal A. C. y a las empresas integrantes de la Asociación de Empresarios del Parque Industrial y Puerto del Sauzal A. C; Sardinera Bahía Magdalena S.A. de C.V., Productos Pesqueros De Matancitas S.A de C.V., Pesquera México, S.A de C.V., Naviera y Pesquera del Pacífico S.A. de C.V., Pesquera Casreal S. de R.L. de C.V., Del Mar Industrial S. A. de C. V., y Conservera San Carlos S.A de C.V., Pesquera Volver a Empezar S. A. de C. V, Pesquera Villalobos, S de RL de CV, Jorge Sánchez (Armador), Pesquera Cabrales, SA de CV, Marítima Intercontinental S. A. de C.V., Esteban Barraza (Armador), Pesquera Géminis S. A. de C. V., Maricultura S. A. de C.V., Pesquera Ruiz Martínez, SA de CV, Manuel Mejía (Armador), Productos de Ensenada, S.A. de C. V., Oscar Velarde (Armador), Pesquera Volver a Empezar S. A. de C. V., Pesquera México, Procesadora Océanos S. A. de C. V., Productos Marinos A B C S. A. de C. V., Pesquera Han Young S. A. de C. V., Seafood, Trading S. A. de C. V., Empacadora Mar S. A. de C. V., Océano Industrial, Alimentos Concentrados California S. A. de C. V., Promarinsa, Pesquera Cortez S. A. de C. V., California Bahia S. A. de C. V., Proesa, Inter. marketing de México, Procean S.A. de C. V., Calfish S. A. de C. V. por la facilitación en la obtención de muestras y al Centro Interdisciplinario de Ciencias del Mar (CICIMAR-IPN), por el procesamiento de las muestras que se realizó a través de los proyectos que se desarrollaron durante estos años en el Laboratorio de Morfofisiología y que estuvieron a cargo del Dr. Julián René Torres Villegas y la Dra. Rosa Isabel Ochoa Báez:

- “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” Registro SIP: 20070991.
- “Evaluación del efecto de la atresia ovárica y el parasitismo testicular en las poblaciones de sardina monterrey (*Sardinops sagax*) sujetas a explotación pesquera en Bahía Magdalena, B.C.S. México” Registro SIP: 20121550.

Índice.

Índice.....	I
Lista de figuras.....	III
Lista de tablas.....	VI
Glosario.....	VII
Resumen.....	XIII
Introducción.....	1
Antecedentes.....	7
Justificación.....	13
Objetivo general.....	16
Objetivos particulares.....	16
Área de estudio.....	17
Material y Método.....	18
Muestreo.....	18
Trabajo de laboratorio.....	19
1.- Proceso histológico.....	19
2.-Estimación del encogimiento del tejido por el proceso histológico.....	20
3.-Comparación entre métodos para estimar la fecundidad parcial individual (F_{pi}).....	21
3.1.-Comparación de la F_{pi} obtenida por los tres métodos.....	29
4.-Estimación de los índices de atresia.....	30
4.1.-Prevalencia de atresia.....	30
4.2.- Intensidad relativa individual de atresia α	30
4.3.- Intensidad relativa poblacional de atresia α	31
5.- Estimación de la fecundidad parcial individual real ($\widehat{F_{pi}}$).....	31
5.1.- Comparación de la estimación de la F_{pi} y $\widehat{F_{pi}}$	32
Resultados.....	33
1.- Caracterización.....	33

2.-Estimación del encogimiento de tejido por proceso histológico.....	34
3.-Comparación métodos para estimar la F_{pi}	38
4.-Estimación de los índices de atresia.	57
4.1.-La prevalencia de atresia	57
4.2.- La intensidad relativa individual de atresia α	58
4.3.-La intensidad relativa poblacional de atresia α	59
5.- Estimación de la fecundidad parcial individual real ($\widehat{F_{pi}}$). .)	60
5.1.- Comparación estadística de los resultados de la estimación de la F_{pi} y $\widehat{F_{pi}}$. .)	60
Discusión.....	64
Conclusiones.....	79
Recomendaciones.....	81
Bibliografía.	83

Lista de figuras.

Figura 1.- Área de incidencia de la pesquería de sardina monterrey (<i>S. sagax</i>) en Baja California	18
Figura 2.- Ejemplo Simplificado del método del Disector Físico.....	26
Figura 3.- Frecuencia observada de los diferentes estadios ováricos a lo largo de la temporada de puesta 2007 de la sardina monterrey (<i>S. sagax</i>) en la costa occidental de Baja California.....	33
Figura 4.- Comparación de las distribuciones de diámetros de los oocitos de <i>S. sagax</i> obtenidos a partir de mediciones de oocitos fijados en preparaciones en fresco vs. diámetros de oocitos obtenidos en cortes histológicos. $\alpha = 0.05$, $F = 10.22$, p -Valor = 0.002 y $gl = 53$	34
Figura 5.- Comparación de las medias de diámetros de los oocitos de <i>S. sagax</i> medidos en en preparaciones fijadas en fresco vs. diámetros de oocitos medidos en cortes histológicos y corregidos por encogimiento por efecto de la técnica histológica.	35
Figura 6.- Curvas de calibración del diámetro promedio individual de los oocitos intraováricos en el estadio de madurez final de la sardina monterrey (<i>S. sagax</i>).....	37
Figura 7.- Comparación de las estimaciones de fecundidad parcial de <i>S. sagax</i> obtenidas con el Método Gravimétrico vs. Estimaciones con el método de Weibel y Gomez.....	42
Figura 8.- Comparación de las estimaciones de fecundidad parcial de <i>S. sagax</i> obtenidas con el Método Gravimétrico y el Estereológico de Weibel y Gomez corregido considerando el encogimiento producido por el efecto de la técnica histológica	42
Figura 9.- Comparación de la estimación de fecundidad parcial individual de <i>S. sagax</i> obtenida con el Método Gravimétrico, vs. el Disector $130\mu\text{m}$	44

Figura 10.- Comparación de la estimación de fecundidad parcial individual de <i>S. sagax</i> obtenida con el Método Gravimétrico, vs. el Disector 170 μ m.....	44
Figura 11.- Esquema teórico en 2D que representa las dos superficies que definen el disector físico aplicado sobre una esfera que representa al oocito, donde se genera un sistema de ángulos rectángulos <i>abe</i> y <i>acd</i> que se propone para estimar la distancia entre los perfiles del disector.....	46
Figura 12.- Comparación de la estimación de fecundidad parcial individual de <i>S. sagax</i> obtenida con el Método Gravimétrico, vs El Disector 130 μ m corregido.....	48
Figura 13.- Comparación de la estimación de fecundidad parcial individual de <i>S. sagax</i> obtenida con el Método Gravimétrico, vs. El Disector 170 μ m corregido.....	48
Figura 14.- Comparación de las estimaciones de fecundidad parcial individual de la sardina monterrey (<i>S. sagax</i>) por los tres métodos empleados en este trabajo.....	49
Figura 15.- Comparación de las estimaciones de fecundidad parcial individual de la sardina monterrey (<i>S. sagax</i>) por los tres métodos empleados en este trabajo, aplicando factores de corrección al método estereológico y los disectores de 130 y 170 μ m	50
Figura 16A.-. Curva de calibración Gravimétrico vs. estereológico de Weibel y Gomez en <i>S. sagax</i>	51
Figura 16B.- Curva de calibración entre el método Gravimétrico vs. estereológico de Weibel y Gomez Corregido en <i>S.sagax</i>	51
Figura 17A.-. Curva de calibración Gravimétrico vs. Disector 130 μ m en la sardina monterrey (<i>S. sagax</i>).....	52
Figura 17B.- Curva de calibración Gravimétrico vs. Disector 130 μ m Corregido en la sardina monterrey (<i>S. sagax</i>).	53

Figura 18B.- Curva de calibración método Gravimétrico vs. Disector 170 μ m Corregido en la sardina monterrey (*S. sagax*)..... 55

Figura 19.- Prevalencia de atresia α observada durante la temporada de puesta de *S. sagax*. 57

Figura 20.- Intensidad relativa de atresia α observada durante la temporada de puesta de *S. sagax*..... 58

Figura 21.-Atresia poblacional observada durante la temporada reproductiva de *S. sagax*..... 59

Figura 22.-Comparación entre la fecundidad parcial individual (***F_{pi}***) y la fecundidad parcial individual real (***F_{pi}***)..... 60

Figura 23.- Comparación entre la fecundidad parcial individual (*F_{pi}*) y la fecundidad parcial individual real (***F_{pi}***) por meses, en relación con el índice de intensidad relativa poblacional de atresia α60

Lista de tablas.

Tabla I.- Representación simplificada del proceso del Disector Físico	26
Tabla II.- Parámetros para la estimación del tamaño mínimo de muestra.	38
Tabla III.- Valores promedio de fecundidad parcial individual de <i>S. sagax</i> obtenido mediante la aplicación del método Gravimétrico asistido por Procesamiento Digital de Imágenes., durante la temporada de pesca 2007, tomadas a bordo de la flota sardinera con base en Ensenada BC.....	39
Tabla IV.- Valores de fecundidad parcial individual de <i>S. sagax</i> obtenidos mediante la aplicación del método estereológico de Weibel y Gomez con los datos observados y con los datos corregidos con 7.57%por efecto de proceso histológico, para la temporada de pesca 2007, tomadas a bordo de la flota sardinera con base en Ensenada BC.	40
Tabla V.- Resultados de los análisis de varianza de la fecundidad de la sardina monterrey (<i>S. sagax</i>) donde se comparan los datos obtenidos con el método gravimétrico, el método estereológico y el método gravimétrico el estereológico corregido.	41
Tabla VI.- Valores de fecundidad parcial individual de <i>S. sagax</i> obtenido mediante la aplicación del Disector físico a 130 y 170 μ m, durante la temporada de pesca 2007, en Ensenada BC.	43
Tabla VII.- Ventajas y desventajas de los métodos analizados	56
Tabla VIII.- Resultados de las estimaciones de fecundidad parcial individual y fecundidad parcial individual real, por mes obtenidas por el método estereológico de Weibel y Gomez.....	62

Glosario.

Atresia.- Mecanismo por el cual los oocitos presentes en el ovario, son reabsorbidos en cualquier fase de desarrollo. Se trata de un proceso de muerte celular programada (Lambert, 1970).

Atresia α (alfa)- Estadio temprano de atresia, que se caracterizó por cambios en la zona pelúcida, la cual presentó rupturas y ondulaciones, más prolongadas en medida que se avanza el proceso de atresia. El ooplasma muestra ligeras alteraciones siendo evidentes signos de vacuolización (Lambert, 1970).

Atresia β (beta)- Estadio de atresia caracterizado por la reabsorción de los componentes del núcleo, del ooplasma y las capas envolventes, formando una estructura de aspecto variable (Lambert, 1970).

Vitelogénesis avanzada.- Etapa del ciclo ovárico caracterizada por la presencia de abundantes oocitos en desarrollo con gránulos de vitelo proteico denso (Wallace & Selman, 1981).

Biomasa.- El peso total de un grupo (o stock) de organismos vivos o de alguna fracción definida de éste, en un área, en un momento trófico (FAO, 2017).

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

Biomasa Reproductora del Stock (SSB).- El peso total de todos los peces en la población que contribuyen a la reproducción. A menudo se define convencionalmente como la biomasa de todos los individuos por encima de "la edad en la primera madurez" o "el tamaño en la primera madurez" (FAO, 2017).

Binarización.- Herramienta del procesamiento de imagen cuyo objetivo es convertir la imagen digital en una imagen en blanco y negro, de tal manera que se preserven las propiedades esenciales de la imagen (Pertusa Grau, 2003).

Densidad numérica.- Numero discreto de objetos o estructuras por unidad de volumen (Pertusa Grau, 2003).

Desovador asincrónico.- Producción de gametos oocitos) en diferentes fases del desarrollo de manera diferencial en la temporada. Se aplica a la producción del ovario en los peces con desoves múltiples en la estación reproductiva (Tyler & Sumpter, 1996).

Desovante parcial.- Es relativo a las especies o grupos de especies de peces capaces de producir desoves múltiples en la temporada reproductiva (Parker, 1980).

Disector físico.-Método utilizado para contar partículas a partir una muestra de volumen conocido, el cual se define por el área dos cortes seriados separados entre sí por una distancia conocida, denominada profundidad, la cual debe ser menor al diámetro de la partícula de interés. La primera sección es conocida como "sección de referencia" y la inferior "sección de búsqueda". El procedimiento consiste en identificar las partículas en ambas secciones, si las partículas aparecen repetidas en ambas, las partículas serán descartadas para la estimación del número de partículas por unidad de volumen, caso contrario si no aparecen repetidas (Sterio 1984).

Estereología.- Disciplina que permite obtener información de estructuras de tres dimensiones a partir de cortes de dos dimensiones, seriados, paralelos y equidistantes, mediante la aplicación de principios matemáticos basados en la probabilidad geométrica (área / volumen) y siendo estadísticamente significativa (Weibel, 1979).

Fecundidad.- Número total de oocitos que potencialmente pueden ser producidos por una hembra (Hunter *et al.*, 1985).

Fecundidad determinada.- En peces con fecundidad determinada, el stock de oocitos maduros a ser desovados durante la temporada de puesta se define antes

del inicio de esta. Es considerada equivalente a la fecundidad anual potencial (Hunter *et al.*,1992).

Fecundidad indeterminada.- En peces con fecundidad indeterminada, el stock de oocitos maduros a ser desovados durante la temporada de puesta no se define antes del inicio de esta. Este término se refiere a especies en las que la fecundidad anual potencial no se fija antes del inicio de la temporada de puesta. Los oocitos no madurados continúan madurándose y desovándose durante la época de desove. (Hunter *et al.*, 1992).

Fecundidad parcial individual (*F_{pi}*)- Es el número de oocitos por puesta o desove parcial (Saborido-Rey, 2008).

Fecundidad potencial.- Es el número de oocitos que en una estación determinada están preparados para desarrollarse y ser liberados (Saborido- Rey, 2008)

Fecundidad real.- Es el número real de oocitos que son liberados en una estación reproductiva ya que una parte de los que constituyen la fecundidad potencial (a veces muchos) no llegan a ser puestos y se quedan en el ovario para ser después reabsorbidos, por tanto, la fecundidad real es igual o inferior a la potencial. (Saborido-Rey2008)

Fecundidad total relativa.-La fecundidad relativa es el número de oocitos por unidad de peso (g) (Saborido-Rey, 2008)

Folículo postovulatorio (*Fpo*)- Estructura intraovárica presente sólo después de haber ocurrido la ovulación en los peces. Constituida por las capas epiteliales colapsadas que formaron el folículo, la granulosa y la teca externa. Presenta una morfología característica con signos de muerte celular, según el tiempo transcurrido desde el momento de la ovulación (Hunter *et al.*, 1985).

Fracción de área.- Es el área que ocupa un objeto en cuestión con respecto al área total de la imagen en análisis (Pertusa Grau, 2003).

Fracción de volumen.- Es el volumen que ocupa un objeto en cuestión con respecto al volumen total de la estructura en análisis (Pertusa Grau, 2003).

Capa Granulosa.- Capa epitelial simple envolvente en la parte externa de la zona pelúcida del oocito, con células cúbicas o columnares (Nagahama, 1983).

Capa de la teca externa.- Capa de células que envuelven al oocito, la cual se forma a partir de un tipo de célula indiferenciada que se localiza en el espacio extravascular del estroma. Se caracterizan por tener un núcleo ovoide, cromatina periférica (Grier 2000).

Folículo.- Se refiere al oocito y los tejidos que lo envuelven (Saborido-Rey, 2008).

Hidratación.- Fase final de la maduración del oocito, Característica de los peces que producen huevos pelágicos, donde es notable el incremento tamaño y volumen. Se caracteriza por el vitelo transformado por proteólisis en una sustancia finamente granular, alojada en grandes vacuolas con abundante ingreso de líquido al interior del ooplasma y del folículo mismo (Wallace & Selman, 1981)

Iteróparos.- Término que se aplica a las especies que se reproducen varias veces en su vida (Munro, 1990).

Morfometría.- Conjunto de técnicas que permiten obtener las características dimensionales de los objetos (área, perímetro, longitud etc.) (Pertusa Grau, 2003).

Perfil.- Representación en dos dimensiones de una partícula tridimensional (Pertusa Grau, 2003).

Pesquería.- Conjunto de sistemas de producción pesquera, que comprenden en todo o en parte las fases sucesivas de la actividad pesquera como actividad económica, y que pueden comprender la captura, el manejo y el procesamiento de un recurso o grupo de recursos afines y cuyos medios de producción, estructura organizativa y relaciones de producción ocurren en un ámbito geográfico y temporal definido (SAGARPA, 2017).

Plano de búsqueda.- Plano inferior del disector físico, obtenido a partir de corte histológico a partir del cual se hace la identificación de las partículas a contabilizar (Pérez-Olvera *et al.*, 2012).

Plano de referencia.- Plano superior del disector físico, obtenido a partir de corte histológico (Pérez-Olvera *et al.*, 2012).

Potencial reproductivo de la población.- La capacidad de la población para producir huevos y larvas viables (Saborido- Rey *et al.*, 2011).

Prevalencia de atresia.- La proporción de hembras maduras no desovantes que presentan atresia α en los oocitos en madurez final, respecto al total de hembras maduras no desovantes analizadas (Kurita *et al.*, 2003).

Procesamiento digital de imágenes.- Conjunto de técnicas aplicadas a las imágenes digitales con el objetivo de mejorar la calidad, facilitar la búsqueda de información (Pertusa Grau, 2003).

Proteólisis.- Etapa del estadio de madurez final del oocito caracterizado por la lisis de los glóbulos de vitelo proteico, paso previo a la hidratación (Wallace & Selman, 1981).

Reclutamiento.- Incorporación de organismos a una etapa de desarrollo dentro del ciclo de vida de la especie, reclutamiento larval, reclutamiento juvenil reclutamiento al stock reproductivo. (Trujillo-Millán, 2009.)

Reclutamiento a la pesquería.- El proceso por el cual los peces entran en el stock explotable y se vuelven susceptibles a la pesca (FAO, 2017).

Relación Stock - Reclutamiento.- La relación entre el nivel de biomasa de los padres (por ejemplo, el tamaño de la población reproductora) y el nivel de reclutamiento posterior (FAO, 2017).

Segmentación.- Herramienta del procesamiento digital de imágenes cuyo objetivo es dividir la imagen digital en varias partes (grupos de píxeles) u objetos, con la

finalidad de simplificar y/o cambiar la representación de una imagen en otra más significativa y más fácil de analizar (Pertusa Grau, 2003).

Sesgo.- El sesgo es la desviación de los valores estimados en relación con los valores reales de una determinada población (Santamaría *et al.*, 2003).

Stock.- Grupo de individuos en una especie que ocupa un rango espacial bien definido independiente de otros stocks de la misma especie. Este grupo puede considerarse como una entidad con fines de gestión o de evaluación (FAO 2017).

Vitelo.-Reservas del oocito formadas por lipoproteínas y fosfoproteínas, derivadas principalmente de la vitelogenina (Tyler & Sumpter, 1996).

Vitelogénesis avanzada.- Etapa del ciclo ovárico caracterizada por la presencia dominante de ovarios que contienen abundantes oocitos con gránulos de vitelo denso y/o en hidratación (Lambert, 1970).

Vitelogénesis avanzada.- Etapa del ciclo ovárico caracterizada por la presencia de abundantes oocitos en desarrollo con gránulos de vitelo proteico denso (Wallace & Selman, 1981).

Resumen.

La sardina monterrey es la especie objetivo de la pesquería de pelágicos menores en México, como todas estas pesquerías tienen el problema de las grandes variaciones en abundancia. Estos cambios de abundancia se han tratado de explicar a partir de los cambios en la mortalidad de huevos y larvas, así como a través de los modelos stock y reclutamiento donde se asume, que la fecundidad total relativa y la producción anual de huevos no varían. Durante las últimas décadas se ha generado evidencia de que el reclutamiento en poblaciones de peces no está directamente relacionado con la biomasa del stock desovante, en estas discusiones se reconoce el efecto de las condiciones parentales tales como la edad, la condición nutricional, entre otros. En estos mecanismos la atresia se reconoce como mecanismo de control de la fecundidad. Lo anterior justifica la necesidad de hacer un seguimiento preciso de las tasas de producción de oocitos de la población desovante. El problema fundamental es la carencia de metodologías que permitan hacer estimaciones cuantitativas del efecto de la atresia en la fecundidad. Este tema se ha abordado en especies de peces con fecundidad determinada, a partir del seguimiento de la producción neta de oocitos a lo largo de la temporada reproductiva, con aplicaciones de estereometría. El tema apenas se ha mencionado en especies con fecundidad indeterminada como la sardina monterrey debido a la carencia de metodologías que permitan cuantificar estos procesos. En el presente trabajo presenta la validación e inter-calibración de los métodos de Weibel y Gomez y el Disector Físico con dos profundidades, con estimaciones de fecundidad con el método gravímetro como referencia. Se identificaron y evaluaron las fuentes de sesgo, se reconocen como fuentes de sesgo el encogimiento por el tratamiento histológico, y el efecto del tamaño y la densidad de los oocitos en el ovario maduro. Se estimaron factores de corrección para el sesgo generado por ambas fuentes. No se encontraron diferencias significativas entre los resultados corregidos de los métodos comparados. Se estimaron los índices de atresia los cuales mostraron tendencia incremental con el avance de la temporada de puesta. Se estimó la fecundidad parcial individual real, la cual es el compromiso entre la fecundidad potencial menos reabsorción por atresia, y

se observa una reducción estadísticamente significativa, lo cual evidencia el control de la producción de oocitos por el proceso de atresia.

Con los resultados del presente estudio se concluye, que los métodos estereológicos analizados son técnicas que permiten obtener resultados precisos y reproducibles de la fecundidad y atresia en la sardina monterrey. Los resultados obtenidos permiten plantear los métodos estereológicos como herramientas para analizar la relación entre la biomasa de la población reproductora y el reclutamiento. Se propone el uso Disector Físico como un método de referencia para validar e inter-calibrar los métodos estereológicos basados en perfiles, a fin de estimar el número de oocitos en las diferentes etapas de desarrollo ovárico y obtener una aproximación al potencial reproductivo.

Palabras clave: Estereología, Fecundidad parcial, Atresia, Disector Físico, Método Gravimétrico, Método de Weibel y Gomez

Abstract.

The Pacific sardine is the target species of the small pelagic fishery in Mexico, as all these fisheries have the problem of large changes in abundance. These abundance changes have been explained with changes in egg and larval mortality, as well as the relationship between stock and recruitment where it is assumed that relative total fecundity and annual egg production don't vary. During the last decades there has been evidence that recruitment in fish stocks is not directly related to the spawning biomass, in these argue the parental conditions effect such as age, nutritional status and others are recognized. In this, atresia is recognized as a mechanism for controlling fecundity. This justifies the need to accurately follow the oocyte production rates of the spawning population. The fundamental problem is the lack of methodologies that make it possible to make quantitative estimates of the effect of atresia on fecundity. This issue has been addressed in fish species with determined fecundity, from the monitoring of the net production of oocytes throughout the reproductive season, with applications of stereology. The issue has hardly been mentioned in species with indeterminate fecundity such as the monterrey sardine due

to the lack of methodologies that allow quantifying these processes. In the present work, it presents the validation and inter-calibration of the Weibel and Gomez and the Physical Dissector methods with two depths, with fecundity estimates with the gravimeter method as a reference. The sources of bias were identified and evaluated; the sources of bias were recognized as shrinkage by histological treatment and the effect of oocyte size and density on the mature ovary. Correction factors are estimated for the bias generated by both sources. No significant differences were found between the corrected results of the compared methods. Atresia rates were estimated, which showed an incremental trend with the advance of the spawning season. Real individual batch fecundity was estimated, which is the compromise between potential fecundity less atresia reabsorption, and a statistically significant reduction is observed, which evidences the control of oocyte production by the atresia process. With the results of the present study we conclude that the stereological methods analyzed are techniques equivalent to the gravimetric method. The results presented allow us to propose stereological methods as tools to analyze the relationship between spawning stock biomass and recruitment. The use of Physical Dissector is proposed as a reference method to validate and inter-calibrate the stereological methods based on profiles, in order to estimate the number of oocytes in the different stages of ovarian development and to obtain an approximation to the reproductive potential.

Keywords: Stereology, Batch Fecundity, Atresia, Physical Dissector, Gravimetric Method, Weibel Method and Gomez

Introducción.

La sardina monterrey (*Sardinops sagax*) es la especie objetivo de la pesquería de peces pelágicos menores en México (SAGARPA, 2012). Esta pesquería aporta a la producción nacional el 35% del total del peso desembarcado (SAGARPA, 2014). Esta producción es materia prima de una industria generadora de numerosos empleos y ejerce una fuerte incidencia en otras áreas de la industria alimentaria. Sin embargo, en México, a pesar de la importancia de este recurso no se ha hecho una adecuada gestión de la pesquería. Una alternativa para mejorar la gestión de este recurso es la evaluación de sus parámetros biológicos, como la fecundidad, temporalidad del desove y frecuencia de puesta, las cuales son el punto de partida para conocer la magnitud de las existencias (Torres-Villegas, 1986).

Las sardinias presentan una distribución anti-tropical, asociada a las corrientes de mayor productividad de los océanos (Parrish *et al.*, 1989), coincidiendo su época de puesta con los ciclos de producción planctónica en las áreas de desove, lo que permite aprovechar las condiciones óptimas de producción y disponibilidad de alimento para las larvas (Csirke, 1988). En este sentido, *S. sagax* es un clupeido de amplia distribución en la costa Oriental del Océano Pacífico, desde el sur de Alaska hasta Cabo San Lucas, BCS., México, incluyendo el Golfo de California (COSEWIC, 2002). Es una especie costera que forma grandes cardúmenes, tiene un ciclo de vida corto el cual se desarrolla en la columna de agua, además de una tasa de crecimiento individual y mortalidad alta, periodos de reproducción prolongados, una fecundidad alta y maduración temprana (Whitehead, 1985; COSEWIC, 2002). Es una especie iterópara con desarrollo asincrónico de los oocitos, es decir en el ovario de la sardina se pueden identificar oocitos en todos los estadios de desarrollo, desde oogonias hasta estadios post-ovulatorios (FPO) de 0, 1, y 2 días, (Torres-Villegas *et al.*, 1995).

Hjort (1914) menciona que una característica compartida entre muchas de las pesquerías de peces alrededor del mundo, son las fluctuaciones en abundancia. En este sentido, las pesquerías de anchoas y sardinias en el mundo incluida la sardina monterrey no es la excepción (Lluch-Belda *et al.*, 1989; Cisneros-Mata *et al.*, 1995;

Schwartzlose *et al.*, 1999). Parrish *et al.* (1989) plantean que la variabilidad en la abundancia ha hecho que estos peces sean especialmente difíciles de administrar y, en algunos casos, ha causado graves daños o incluso el colapso de pesquerías regionales. Se trata de cambios fuertes en el reclutamiento, Bakún (1995) define el término como:

“La cantidad de peces jóvenes que sobreviven a las distintas etapas de huevo, larva, juvenil, etc. para alcanzar un tamaño en el que se vuelven susceptibles a los artes de pesca y comienzan a ser capturados por la pesquería”.

Además, menciona que el problema de los cambios de abundancia *“sigue sin resolverse después de décadas de interés y esfuerzo científico”.*

En esta discusión, Csirke (1980) menciona que en los mecanismos que controlan el reclutamiento, se les ha dado poca importancia, a la variabilidad de las tasas de producción de oocitos en relación a la condición de la población adulta. Para abordar el estudio de la variabilidad en las tasas de producción de oocitos es necesario conocer la dinámica de la maduración en el ovario; descrita por Ganas (2014) como la interacción entre el desarrollo folicular, el crecimiento del oocito (oogénesis), la puesta, la reabsorción folicular o atresia y los factores que los afecta. En peces de desoves múltiples como la sardina monterrey la dinámica ovárica es compleja debido a que el reclutamiento de oocitos a la fecundidad anual no es un evento único. Los oocitos son reclutados y desovados por grupos o desoves parciales a lo largo de la temporada de puesta.

Para iniciar el estudio de las tasas de producción de oocitos, es necesario conocer las tácticas reproductivas de la especie, en el caso de la sardina monterrey, incluye una marcada estacionalidad (Murua *et al.*, 2003). Además de una producción constante de oocitos a lo largo de la temporada de puesta, de manera que el número de oocitos que se va a producir en la temporada no está definido, es decir, es una fecundidad indeterminada, descrita por Hunter y Goldberg (1980) y Hunter y Macewics (1980), en la anchoveta norteña (*Engraulis mordax*). Otra característica es la alta producción de huevos, además de tratarse de peces iteróparos, puesto que, cada hembra puede tener varios desoves a lo largo de la temporada de puesta, el

primer indicador de que esto ocurría así, fue descrito por Clark (1936). En su análisis sobre la distribución de diámetros de los oocitos de la sardina de California, describe entre cinco y siete modas, las cuales sugerirían un número igual de desoves por temporada. No fue hasta la década de los 80's que quedó claro que la sardina monterrey presenta una alta dinámica en su desove y en la producción de oocitos (Hunter *et al.*, 1985), esta dinámica de producción de oocitos tan alta y variable ha dificultado el hacer el seguimiento y cuantificación de las tasas de producción y su variación, es decir la fecundidad y el efecto modulador que ejerce sobre ella el proceso de atresia. El problema fundamental consiste en que se requieren técnicas cuantitativas para estimar la tasa de producción de oocitos y el efecto de la atresia, lo cual necesariamente se observa en el análisis histológico. Esto se ha empezado a abordar en algunas especies de peces con fecundidad determinada. Murua *et al.* (2003) plantean que los datos disponibles no permiten extrapolar esta experiencia a peces con fecundidad indeterminada, donde sigue sin poder resolverse el tema. Por su parte Armstrong & Witthames (2012) señalan la importancia de obtener información del ciclo reproductivo en series de tiempo, con la finalidad de establecer la influencia de las características parentales y el control de la atresia en la producción de oocitos. Se trata de describir los mecanismos subyacentes en el reclutamiento de los oocitos en el ovario y los asociados al desove, así como la influencia de los grupos de edad y la condición de los peces adultos desovantes es decir la influencia parental. Actualmente existen pocos datos relacionados con estos procesos, Para obtener los datos necesarios y construir las series de tiempo requeridas en los peces que tiene fecundidad indeterminada. Es evidente que los métodos tradicionales y el enfoque para determinar la fecundidad de las poblaciones de peces como la sardina hasta ahora han sido insuficientes.

Desde el punto de vista del manejo pesquero, es evidente la importancia que tiene el cuantificar y entender los parámetros reproductivos así como el impacto de las condiciones parentales sobre estos. En estas discusiones en los últimos años se ha dado mucho peso al tema de la fecundidad. Lowerre-Barbieri 2009 menciona:

“La fecundidad es un aspecto importante de la biología reproductiva de los peces, su conocimiento es de gran importancia en la gestión de las poblaciones de peces. Es un parámetro indispensable para el cálculo potencial reproductivo de una población, y mejora nuestra capacidad de estimar el reclutamiento”.

En este sentido Marshall *et al.* (1998) describieron dos aplicaciones para las estimaciones de fecundidad poblacional:

“Quizá lo más importante sea entender la relación entre la biomasa de la población reproductora y el reclutamiento y la segunda aplicación de la información sobre la fecundidad es estimar la biomasa de la población reproductora por el Método de la Producción Diaria de Huevos (DEPM por sus siglas en inglés).”

Los métodos más usados para estimar la fecundidad parcial, son el método volumétrico y el gravimétrico (McGregor, 1957), en ellos se estima el tamaño del grupo de la moda más avanzada, el cual, al alcanzar la madurez, se separa del resto de las modas y crece a mayor velocidad que el resto hasta alcanzar el desove. La diferencia consiste en que esta estimación se hace en una muestra del ovario obtenida en peso o en volumen según el método. Una variante del método gravimétrico fue propuesta por Hunter y Goldberg (1980) donde el grupo de la moda más avanzada se identifica por los oocitos que están hidratados, estadio que aparece apenas unas horas antes del desove. En todos los casos el valor de fecundidad por unidad de peso o volumen se extrapola al peso o volumen de los ovarios. Existen métodos más recientes para la estimación del número de oocitos, basados en principios estereológicos además del volumétrico o gravimétrico (Saborido-Rey, 2008).

Otro de los puntos importantes para valorar las tasas de producción de oocitos es el estudio del proceso de atresia y la incidencia de evento, el cual afecta negativamente la tasa de producción de oocitos. Lambert (1970) definió la atresia como el mecanismo por el cual los oocitos presentes en el ovario, son reabsorbidos en cualquier fase de desarrollo. Varios factores han sido descritos como asociados con

atresia folicular en anchoas y sardina, Hunter y Macewicz (1985) describieron el tamaño corporal y el régimen de alimentación deficiente como uno de los principales factores asociados con la atresia. Valdevenito *et al.* (2011) mencionaron que los estímulos ambientales aparecen como los más relevantes y más específicamente los que hacen referencia al fotoperiodo y la temperatura, lo cual coincide con lo descrito por Tsinganis *et al.* (2012) citado por Gantias (2014) quienes además mencionan a la temperatura como uno de los principales factores.

La mayoría de los estudios cuantitativos sobre la atresia folicular en anchoas y sardinas se centran en las estimaciones de atresia durante las primeras etapas de la reabsorción, debido a la dificultad para identificar las etapas posteriores de reabsorción (Hunter y Macewicz, 1985), lo cual puede llegar a generar estimaciones sesgadas. La confusión más habitual es entre los FPO's y los folículos atrésicos β sin vitelo o β tardíos.

Autores como Hunter *et al.* (1992); Greer Walker *et al.* (1994); Witthames y Greer Walker (1995); Kurita *et al.* (2003) entre otros, documentan que la producción potencial de oocitos por la población desovante, está definida al inicio de la temporada de puesta. Estos autores concluyeron que la producción total de oocitos por parte de la población, muestra un efecto modulador de la producción por la incidencia de atresia. Sin embargo la relación entre la fecundidad y la atresia, en peces con fecundidad indeterminada como la sardina monterrey no se ha estudiado.

El principal problema para la evaluación de las tasas de producción de oocitos y evaluar el efecto de la atresia como mecanismo de control de la fecundidad es la ausencia de técnicas que permitan hacer la cuantificación de la frecuencia de oocitos diferenciados por estadio de madurez. Es decir, se requiere de métodos que permitan reconocer los oocitos por sus características histológicas y no por diámetro como las técnicas comúnmente usadas (métodos gravimétricos y volumétricos). En este sentido, Weibel *et al.* (1966) mencionaron que los métodos estereológicos proporcionan los medios para producir eficientemente datos cuantitativos sobre la estructura interna de los órganos, tejidos y células. Lo anterior abre la posibilidad de utilizar la estereología para hacer estimaciones cuantitativas de estructuras

microscópicas tridimensionales a partir de imágenes en dos dimensiones, con este enfoque se puede valorar la producción de oocitos.

Weibel (1979) establece la estereología considerada como un grupo de herramientas con una base matemática bien definida, para la exploración del espacio tridimensional a partir de cortes bidimensionales o de proyecciones planas. Estos métodos tienen sus bases en "*El principio de Delesse*" el cual establece que la fracción de volumen de un componente en una roca, es proporcional a su fracción de área en una sección transversal, por lo anterior, es posible hacer interpretaciones en tres dimensiones a partir de imágenes bidimensionales. Obteniéndose con esto la información de los diferentes parámetros que definen un objeto (el área, el perímetro, la longitud, el volumen, densidad numérica, etc.) (Weibel, *Op. Cit*). Esto abre la posibilidad de estimar los parámetros que definen cualquier partícula dentro de una matriz, como puede ser el número de oocitos presentes en la gónada.

En este sentido, von Bartheld (2002) hace una diferenciación entre dos grupos de métodos estereológicos, los métodos "2D" basados en perfiles en los cuales para su aplicación es necesario asumir algunos parámetros como la forma, el tamaño y la distribución de las partículas, dentro de estos métodos se encuentra el método de Weibel y Gomez. Por otro lado se encuentran los métodos "3D" en los cuales estos parámetros son estimados directamente, dentro de estos métodos se encuentran incluidos el método del Disector Físico y el Disector Óptico.

Antecedentes.

El conocimiento de los factores que afectan la variación anual en el reclutamiento es uno de los objetivos principales en la ciencia y gestión pesquera (Marshall *et al.*, 1998). Thorsen *et al.* (2006) señalan que el reclutamiento a una población de peces comienza con el potencial reproductivo, mencionan que la fecundidad de la población, es decir, la suma de los valores de fecundidades individuales de todas las hembras maduras puede ser utilizada como una medida del potencial reproductivo. En este sentido, Ganas *et al.* (2014), definen la fecundidad como: “*una medida de la producción de gametos, en otras palabras, la fecundidad es una variable del éxito reproductivo individual, que expresa el número de óvulos producidos por hembra*”. Saborido-Rey y Trippel (2013); Ganas *et al.* (2014) y Hunter *et al.* (1992) mencionan que los estudios de fecundidad son esenciales para entender el potencial reproductivo de las poblaciones de peces y cómo se vincula al reclutamiento, así como lograr un mejor conocimiento de la dinámica de la fecundidad y las causas de su variación. En este sentido, dentro de la discusión sobre los mecanismos que controlan el reclutamiento, se le ha dado importancia menor a la variación de las tasas de producción de oocitos (Csirke (1980).Lo anterior, significa la relación existente entre la fecundidad y la reducción por atresia.

La mayoría de los estudios sobre el proceso de atresia se han restringido a describir sus fases de desarrollo. Lambert (1970) describió 4 estadios de atresia (alfa, beta, gama y delta) en *Poecilia reticulata*, posteriormente Hunter y Goldberg (1980) y Hunter y Macewics (1985), resaltaron la importancia de la identificación de los diferentes estadios de atresia, como una herramienta para la identificación de folículos postovulatorios, debido a que algunos estadios de atresia pueden llegar a ser confundidos con estadios tardíos de folículos postovulatorios, especialmente los oocitos β - atrésicos.

Los estudios donde se evalúa el efecto de la atresia en la fecundidad son escasos, Kurita *et al.* (2003) describieron el proceso de atresia en el arenque del atlántico (*Clupea harengus*), hacen el seguimiento de los índices de atresia y evalúan el efecto del proceso de atresia en la fecundidad, donde encontraron una reducción del 56%.

Torres-Villegas *et al.* (2007) estimaron los porcentajes de atresia folicular en *S. sagax*, concluyen que una incidencia del 2% puede ser considerado normal. Al final de la temporada este porcentaje se eleva a un 5%, lo cual indica el final del máximo de puesta. Otros autores han descrito la influencia de ciertos factores exógenos en el proceso de atresia, tales como los cambios ambientales, cambios en la calidad nutricional de los organismos; además evalúan el efecto que tiene la atresia en el potencial reproductivo y en la reducción en el número de desoves (Burton e Idler, 1984; Kurita *et al.*, 2003). Por su parte, Kjesbu *et al.* (1991) documentaron una reducción de la fecundidad por atresia del 36% en el bacalao (*Gadus Morhua*); Hunter *et al.* (1992) encontraron una reducción de la fecundidad del 8% para el lenguado, *Microstomus pacificus*; Witthames y Greer Walker (1995) documentaron un 12.4 % por efecto de la atresia en el lenguado del Mar del Norte (*Solea solea*); Greer Walker *et al.* (1994) reportaron una reducción de la fecundidad del 13.6 % en la caballa (*Scomber scombrus*).

Las principales restricciones en la estimación de las tasas de producción, son tecnológicas y metodológicas. (Ganias 2014), señala que las estimaciones de fecundidad se realizan tradicionalmente mediante el recuento directo de oocitos discriminándose las partículas en función del diámetro, lo cual conlleva una gran inversión de mano de obra, así como una alta imprecisión, además de descartar hembras con presencia de folículos post-ovulatorios, así como el efecto del proceso de atresia de la estimación. Dentro de este grupo de métodos se encuentran el método gravimétrico y el método volumétrico, oocyte packing density (OPD).

El método gravimétrico es uno de los más empleados en los estudios de fecundidad, y es utilizado como método de referencia en las estimaciones de fecundidad. Este método tiene un grado de precisión aceptable y requiere poca tecnología para aplicación. Sin embargo, no posibilita estimar la incidencia de atresia o la presencia de folículos post-ovulatorios en sus estimaciones. Otra desventaja consiste en que no es un método adecuado para especies con oocitos de tamaño pequeño o para aquellas especies donde el tamaño entre los oocitos que van a ser desovados y el resto no es fácil de diferenciar (McGregor, 1957; Hunter *et al.*, 1985).

Otro método utilizado es el volumétrico, entre las ventajas de la aplicación del mismo, es el bajo costo; sin embargo, es un método impreciso, que al igual que el método gravimétrico no puede emplearse para evaluar las incidencias de atresia ni los folículos post-ovulatorio (Saborido-Rey 2008).

Kurita y Kjesbu (2009) proponen el Oocyte Packing Density, que es un método que proporciona información sobre la dinámica de reclutamiento de los oocitos y eventualmente del potencial reproductivo. Este método se basa en la estimación del número de oocitos por gramo de ovario, diferenciándose entre estadios por medio del análisis de la distribución de diámetros de los oocitos, el conteo de oocitos lo hicieron con un contador automatizado de partículas. Es un método relativamente rápido, sin embargo, una desventaja es la dificultad para discriminar los diferentes grupos de oocitos por diámetros, otra de las desventajas es el costo del equipo para el conteo de partículas.

Por otro lado, existe otro grupo de métodos para la estimación de la fecundidad, los cuales cuantifican el número de oocitos a partir de cortes histológicos, dentro de este grupo están los métodos estereológicos de Weibel y Gomez (1962), y el método del disector físico (Sterio, 1984). Estas técnicas constituyen un poderoso instrumento para obtener estimaciones confiables y con menos fuente de variación de la fecundidad, debido a que la aplicación de esta metodología permite medir el efecto que tienen procesos fisiológicos como la atresia sobre la producción de oocitos. Lo anterior debido a que las estimaciones se hacen directamente sobre la imagen histológica del órgano, lo que constituye una prueba importante del estado fisiológico del organismo (Pertusa, 2003; Perezgómez-Álvarez, 2008). En este sentido Ganas, (2014) señala que:

“Una mejora indudable en la evaluación del potencial reproductivo, es la automatización del proceso de medición y conteo de oocitos mediante el proceso de imagen, además de permitir la cuantificación de tipos foliculares, como oocito previtelogénicos, oocitos atrésicos y Folículos post-ovularios, los que sólo pueden ser identificados por histología”.

Estos métodos tienen su base en la estereología, la cual, se basa en la exploración del espacio tridimensional a partir de proyecciones planas (Weibel, 1979). Esta técnica tiene su origen en la teoría de las probabilidades geométricas desarrollada por Pierre Simón Laplace en 1812. Los primeros modelos abordados por la estereología como tal, fueron los desarrollados por Delesse (1847) quien determinó la composición de minerales en rocas lo que se conoce como el "*principio de Delesse*". Este principio dio pie al desarrollo de un grupo de técnicas que abrió la posibilidad de hacer interpretaciones en tres dimensiones a partir de imágenes bidimensionales. Con estos métodos es posible obtener información de los diferentes parámetros que definen a un objeto incluido en una matriz (área, el perímetro, longitud, volumen, densidad numérica, etc.) (Weibel, 1979).

Uno de estos métodos basados en el principio de "Delesse" es el Método de Weibel y Gomez (1962), el cual es utilizado con éxito para estimar la fecundidad de muchas especies de peces. Este método tiene la ventaja de que permite un diagnóstico completo de los oocitos en el ovario, incluyendo la presencia de folículos postovulatorios, atresia y tamaño de los oocitos. Sin embargo, tiene el inconveniente de requerir un costo elevado en tecnología para su aplicación. Además requiere asumir una serie de características de las partículas a contabilizar (forma de las partículas, distribución y tamaño) las cuales son las principales vías que introducen sesgo dentro de este tipo de estimaciones (von Bartheld, 2002).

Sterio (1984) describió el Método del Disector Físico que es una aplicación de la estereología libre de sesgo, este calificativo es debido a no se requiere asumir características de las partículas a contabilizar (distribución, forma, tamaño), en cambio estas características son estimadas. Es un método utilizado para contar partículas a partir una muestra de volumen conocido, el cual se define por el área dos cortes seriados separados entre sí por una distancia conocida, denominada profundidad, la cual debe ser menor al diámetro de la partícula de interés. La primera sección es conocida como "sección de referencia" y la inferior "sección de búsqueda". El procedimiento consiste en identificar los perfiles de las partículas en ambas secciones, si estos aparecen repetidos en ambos cortes, serán descartados

para la estimación del número de partículas por unidad de volumen, caso contrario si no aparecen repetidos. La principal ventaja de este método es la ausencia de sesgo, permite un diagnóstico completo de los oocitos en el ovario, incluyéndose la presencia de folículos post-ovulatorios y la atresia. Tiene el inconveniente de tener un costo elevado en horas para el proceso de las muestras, así como un alto costo en tecnología para análisis de imagen.

von Bartheld (2002) hizo una revisión de los métodos estereológicos “2D” y “3D”, y tras el análisis concluye que ninguno de los métodos es perfecto, incluso los “3D” que erróneamente se les asigna el calificativo de “insesgado”, en este sentido hace hincapié de la importancia encontrar y minimizar las fuentes de sesgo presentes en las estimaciones, por lo que recomienda que antes de decidir cualquier método se requiere calibrar y validarlos con un método de referencia.

Los antecedentes de estudios de fecundidad con técnicas basadas en principios estereológicos son recientes y, aún en un reducido grupo de especies. Con aplicaciones del método de Weibel y Gomez; Emerson *et al.* (1990) estimaron la fecundidad en *Engraulis mordax* y *Scomber japonicus*, uno de los primeros estudios donde se estima la fecundidad en peces con estas técnicas. Macchi (1993) estimó la fecundidad en *Odontesthes smitti* comparando los resultados del método de Weibel y Gomez con el método gravimétrico, y no encontró diferencias estadísticas significativas entre las estimaciones por los dos métodos. Medina *et al.* (2002) Utilizaron el método de Weibel y Gomez para estimar la fecundidad en *Thunnus thynnus* a lo largo de la migración que esta especie realiza a través del mediterráneo y encontraron que los ovarios del atún rojo de las Islas Baleares contenían cinco veces más oocitos que el atún rojo de Barbate, España. Macias *et al.* (2006) estimaron la fecundidad en el bonito *Sarda sarda*. Concluyen que los métodos histológicos y estereológicos permiten obtener estimaciones adecuadas de la fecundidad de esta especie.

Los estudios donde se emplea el método del disector físico para estimar la fecundidad en peces son aún más escasos, el disector físico se ha utilizado principalmente en estimaciones de oocitos atrésicos (Kurita *et al.*, 2003; Kjesbu *et al.*,

2010), existen pocas aplicaciones de este método para cuantificar los folículos postovulatorios y oocitos en diferentes etapas de desarrollo (Aranda *et al.*, 2009; Aragon *et al.*, 2010).

Son aún menos los estudios donde se hacen las comparaciones entre los resultados obtenidos por los dos métodos anteriormente descritos; Saber *et al.* (2011) no encontraron diferencias estadísticas significativas al estimar la fecundidad parcial en *Thunnus alalunga* mediante los métodos de Weibel y Gomez y el disector físico. Aranda Garrido (2013) estudió la dinámica reproductiva del atún rojo atlántico (*Thunnus thynnus*) aplicó dos procedimientos estereológicos en sus estimaciones del número de folículos ováricos: un método basado en supuestos de forma y tamaño de los folículos y por tanto de naturaleza sesgada (Weibel y Gomez, 1962), y el método del disector libre de supuestos (Sterio, 1984). Al aplicar las pruebas estadísticas no detectaron diferencias significativas entre ambos métodos, sin embargo los resultados muestran que el disector físico produce estimaciones más altas de oocitos en desarrollo y folículos postovulatorios, mientras que el método de Weibel y Gomez sobreestimó folículos atrésicos.

Justificación.

La gestión de la mayoría de las poblaciones explotadas de peces se realiza actualmente con base en modelos que parten de la relación stock – reclutamiento. En este sentido, Marshall *et al.* (2003) mencionan que los modelos tradicionales para explicar la relación entre el stock y el reclutamiento asumen que la fecundidad total relativa y la producción anual de huevos no varían. Sin embargo a partir del análisis de una serie de tiempo en el bacalao (*Gadus morhua*) Marshall *et al.* (1998) concluyen que:

“Durante las últimas décadas se ha generado evidencia de que el reclutamiento en poblaciones de peces no está directamente relacionado con la biomasa del stock desovante”.

La polémica sobre los mecanismos que controlan el tamaño de la población inició en el siglo XX (Chambers & Trippel 1997). El tema fue abordado por Hjort (1914) a través de la hipótesis de los períodos críticos, en la cual propone que, el éxito de una clase anual está determinado en los primeros estadios de desarrollo, donde la disponibilidad del alimento durante la etapa de la primera alimentación exógena constituye una causa relevante de mortalidad. Bakun (1985) resume los mecanismos propuestos que explican la mortalidad instantánea en los primeros estadios de vida, y menciona que:

“Los intentos de relacionar las variaciones en el reclutamiento con variaciones ambientales o en las comunidades biológicas no han sido exitosos”.

Esto lo atribuye a la escasez de información en series de tiempo lo suficientemente grandes. Por otro lado, Smith y Moser (1988) analizaron la serie de huevos y larvas de anchoveta norteña (*Engraulis mordax*) del proyecto CalCOFI y no pueden relacionar la variabilidad en las tasas mortalidad instantánea de huevos y larvas con la variación en el reclutamiento.

A pesar de la discusión sobre la relación entre la población adulta y el reclutamiento, la gestión de la mayoría de las poblaciones de peces se sigue realizando con base en modelos de “stocks” adultos vs reclutamiento. Donde los modelos asumen que el

potencial reproductivo de la población, es proporcional a la población adulta (Trippel *et al.*, 1997).

Csirke (1980) menciona que en esta discusión sobre los mecanismos que controlan el reclutamiento, se le ha dado poca importancia a la variabilidad de las tasas de producción de oocitos en relación a la condición de la población adulta, es decir el efecto parental. Saborido-Rey *et al.* (2011) mencionan:

“El vínculo entre potencial reproductivo y reclutamiento se establece mediante la supervivencia selectiva de huevos y larvas en función de las características parentales”.

Es evidente que para abordar el estudio de la variabilidad en las tasas de producción de oocitos es fundamental conocer la dinámica de la maduración en el ovario (Ganias, 2014), lo que implica contar con metodologías que permita cuantificar las tasas de producción y su variación, es decir la fecundidad y la atresia como mecanismo de control de la fecundidad.

La documentación sobre el efecto de la atresia en la producción neta de oocitos en especies con fecundidad indeterminada es escasa; Saborido-Rey (2008) menciona que se trata de un tema que requiere analizarse. En el caso de la sardina monterrey, la información disponible se restringe a los resultados obtenidos por Torres-Villegas *et al.* (2007) quienes documentaron en esta especie una interrupción de la temporada de puesta asociada a la alta incidencia de atresia en el ovario. Lo anterior sugiere que la atresia incide como elemento modulador en la producción neta de oocitos. Lo cual no ha sido medido formalmente y con ello el proceso no se ha discutido.

Para establecer el efecto de la atresia como mecanismo modulador de la producción neta de oocitos en *S. sagax*, en primera instancia se necesitan adaptar y valorar metodologías para la cuantificación de las tasas de producción, las cuales hasta ahora no se han probado en peces desovadores parciales. Una vez desarrollados estos métodos se estará en condiciones de responder las siguientes preguntas: ¿cuál es el efecto de la atresia en la fecundidad por desove parcial? ¿Existe un

efecto que pueda medirse a lo largo de la temporada de puesta? ¿Es posible estimar la producción de oocitos a partir de la integración de observaciones instantáneas de la fecundidad neta a lo largo de la temporada? La respuesta a las preguntas planteadas resulta de gran importancia, lo cual va más allá del uso de los parámetros reproductivos como indicadores del estado del stock o la fecundidad como parámetro para satisfacer los parámetros para estimar biomasa mediante el método de Producción Diaria de Huevos. Temas por los que se da importancia a estas determinaciones.

El problema fundamental consiste en la aplicación de técnicas cuantitativas para estimar la tasa de producción de oocitos y el efecto de la atresia, lo cual necesariamente se observa en el análisis histológico. Este tema, en algunas especies de peces con fecundidad determinada, se aborda con métodos estereométricos. En el caso de peces con fecundidad indeterminada como la sardina monterrey la información es aún escasa. En este sentido los métodos estereológicos ofrecen una alternativa viable para hacer estas mediciones, la puesta en marcha de estas técnicas requiere la definición de aquellas técnicas que satisfacen la necesidad de información, con las muestras disponibles. Además de reconocer las fuentes de sesgo, plantear estrategias para reducirlo y hacer calibraciones entre los distintos métodos.

Objetivo general.

Adaptar y validar dos métodos estereológicos para aplicarlos a la estimación de las tasas de producción de oocitos en la sardina monterrey en la temporada de puesta 2007 en la pesquería de Ensenada Baja California.

Objetivos particulares.

- I. Caracterizar la temporada reproductiva de *S. sagax*, con énfasis particular en la incidencia de atresia en el 2007.
- II. Adaptar y validar los métodos para estimar la fecundidad: el gravimétrico asistido con procesamiento digital de imágenes (Ganias *et al.*, 2008), el estereológico de Weibel y Gomez (1962) y el disector físico (Sterio 1984), para aplicarlos a la estimación de la fecundidad parcial e índices de atresia en la sardina monterrey.
- III. Cuantificar las frecuencias de atresia folicular, de la sardina monterrey, durante la temporada de puesta del 2007.
- IV. Estimar la fecundidad parcial individual y evaluar el efecto de la atresia, durante la temporada de puesta de la sardina monterrey.

Área de estudio.

S. sagax es una especie de amplia distribución geográfica, en el Océano Pacífico, se distribuye desde el sur de Alaska hasta la península de Baja California México, incluyendo el Golfo de California (Cosewics, 2002). En la costa occidental de la Península de Baja California, se pueden reconocer tres stocks diferentes, de acuerdo con su afinidad a la temperatura del agua. Estos tres Stocks tienen movimientos estacionales de manera simultánea acoplados a la variación de las isotermas en la zona. En el verano se mueven al norte con el fortalecimiento de la contra-corriente Norecutorial y en el invierno al sur con la intensificación de la Corriente de California (Felix-Uraga, 2006).

Gaxiola-Castro y Durazo 2010 hace una descripción detallada de la costa occidental del estado de Baja California, mencionan:

“Esta región está influenciada por el límite sureño del sistema de la Corriente de California (SCC). Presenta características típicas de un sistema de circulación de frontera oriental; surgencias costeras en respuesta a vientos a lo largo de la costa, un flujo superficial hacia el ecuador como respuesta al mecanismo forzante, y una contra corriente subsuperficial dirigida hacia el polo que fluye a lo largo del talud continental. La región sur de la SCC es considerada como una zona de transición (Roden 1971). Cerca de la superficie confluyen la masa de Agua Subártica (ASA) transportada hacia el sur por el flujo de la Corriente de California (CC), así como el Agua Tropical Superficial (ATS) y el Agua Subtropical Superficial (AStS) que provienen del sur y suroeste de la península. Lynn y Simpson (1987)”

Los cambios en las corrientes y la mezcla entre las masas de agua resultantes establecen muchas de las condiciones que modulan la diversidad biológica y la variabilidad química en la región (Durazo y Baumgartner 2002).

Material y Método.

Muestreo

El material que se empleó en el presente trabajo forma parte de la colección histológica de ovarios de *S. sagax* del Laboratorio de Morfofisiología del Cicimar-IPN, el cual cuenta con preparaciones histológicas, inclusiones en parafina, material fijado e información morfométrica. Para este caso las sardinas adultas se obtuvieron a bordo de la flota sardinera con base en Ensenada BC., durante las operaciones de pesca. Se recolectaron un total de 20 lances de pesca en el periodo enero-abril del 2007, la ubicación de los lances se muestra en figura 1. De cada lance se tomaron al azar 70 ejemplares, al momento de embarcar la captura, para un total de 1,400 organismos.

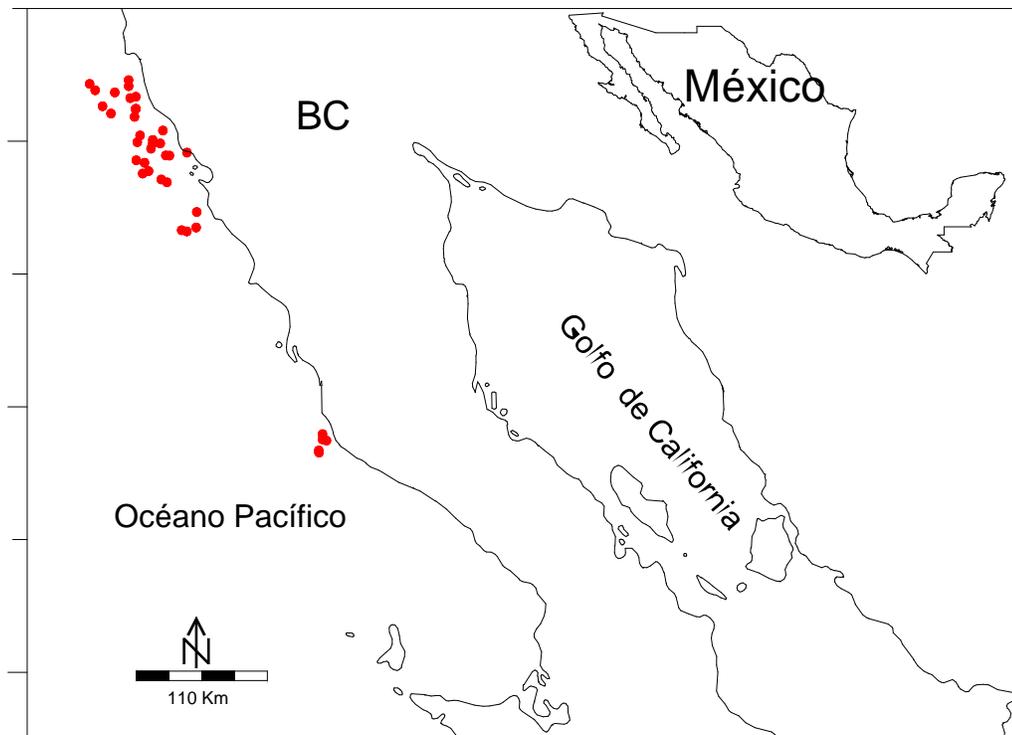


Figura 1.- Área de incidencia de la pesquería de sardina monterrey (*S. sagax*) en Baja California. Los puntos rojos son las posiciones de donde se hicieron los lances de pesca para la temporada de puesta 2007.

Los peces fueron fijados completos en formol al 10% en solución reguladora de fosfatos (pH= 7.0). Para garantizar una mejor fijación, se les hizo un corte a lo largo de la línea media ventral del cuerpo y cortes laterales en la pared del cuerpo a la altura de la región posterior a las aletas pectorales. Las muestras se transportaron al Laboratorio de Morfofisiología del CICIMAR–IPN siguiendo los procedimientos de Torres-Villegas *et al.* (2002).

Trabajo de laboratorio

1.- Proceso histológico

En el laboratorio se registró la longitud patrón, el peso total, el peso de las gónadas, el volumen desplazado de las gónadas y el sexo de cada individuo. Para la caracterización de la temporada y los cálculos de la fecundidad parcial individual (*Fpi*) por el método estereológico de Weibel y Gomez se utilizaron las laminillas de cortes histológicos de la colección del Laboratorio de Morfofisiología del CICIMAR-IPN

Para la estimación de la fecundidad por el método del Disector Físico se procedió a elaborar el material histológico, para esto de cada ejemplar se tomó una sub-muestra de aproximadamente 1 cm³ de la parte media del ovario izquierdo, esta alícuota se procesó con la técnica histológica por inclusión en parafina, los procedimientos de laboratorio se describen en Ochoa-Báez & Torres-Villegas (2007). Se obtuvieron 2 cortes consecutivos de 3µm de espesor en el micrótomo. La separación entre estos cortes se fijó en $\frac{1}{4}$ (130 µm) y $\frac{1}{3}$ (170 µm) del diámetro medio de los oocitos. Las preparaciones se colorearon de forma alternativa con las técnicas Hematoxilina-Eosina, Tricrómica de Mallory (Humason, 1979). El resto de la gónada fue almacenada en formol al 10% en solución reguladora de fosfatos (pH = 7.0). Las hembras se clasificaron con base en los criterios morfológicos usados para el diagnóstico histológico como sigue: a) los estadios preovulatorios de acuerdo con Wallace y Selman (1981), b) los folículos postovulatorios de acuerdo con los criterios de Alarcón *et al.* (1984) y c) los estadios atrésicos según los criterios de Lambert (1970).

2.-Estimación del encogimiento del tejido por el proceso histológico.

Puesto que al aplicar la técnica histológica el tejido sufre un encogimiento, se estimó la reducción del diámetro de los oocitos intraováricos procesados por histología respecto al diámetro de los oocitos fijados, con la finalidad de estimar un factor de corrección, para el diámetro de las partículas a utilizar en la estimación de la fecundidad parcial individual (F_{pi}) por los métodos estereológicos (Weibel 1979)

Para valorar el efecto del encogimiento de los oocitos por el proceso histológico fue necesario hacer la estimación del tamaño de muestra. Para esto se hizo un muestreo aleatorio exploratorio en las preparaciones histológicas de los ovarios de cinco hembras maduras no desovantes, sin oocitos en estados atresicos, las cuales fueron seleccionadas al azar en el grupo de hembras en esta categoría identificadas con el diagnóstico histológico.

El muestreo consistió en medir el área ocupada por el corte de cada uno de los perfiles de los oocitos en la etapa de madurez final, lo cual se hizo en micrografías que se obtuvieron y procesaron con el software AxioVision ver. 4.0. Se midieron sólo los oocitos cuyo perfil incluyera el núcleo celular en cortes aproximados al ecuador, puesto que en la etapa de madurez el núcleo ocupa la región central.

A partir de las áreas de los perfiles de cada oocito se estimó el diámetro de las células. Los cálculos se hicieron con el modelo para estimar el área de un círculo, que es la forma de los perfiles de los oocitos esféricos. Del material fijado restante de cada ovario, de las mismas cinco hembras seleccionadas, se tomaron tres alícuotas de tejido de 50 mg aproximadamente sin la cápsula del ovario. Las sub-muestras se tomaron de la porción media del ovario. El material de cada alícuota se disgregó añadiéndose unas gotas de glicerina-agua (1:1). De cada alícuota se obtuvieron micrografías para obtener la distribución de diámetros de los oocitos fijados por análisis digital con el procesador de imágenes (Ganias *et al.*, 2008).

Con este muestreo exploratorio se obtuvieron las medidas de dispersión del diámetro de los oocitos, las cuales se utilizaron para estimar tamaño de mínimo de muestra,

es decir, el número mínimo de oocitos para estimar la el encogimiento de los oocitos por efecto del proceso histológico, con el método iterativo propuesto por Sokal & Rohlf (1995). Posteriormente, al azar, se seleccionaron los organismos para estimación de encogimiento por proceso histológico

Para estimar el encogimiento de los oocitos en la etapa de madurez final se compararon los diámetros obtenidos con el método gravimétrico y las estimaciones hechas por micrometría en las preparaciones histológicas. El encogimiento se estimó como la diferencia promedio del diámetro por hembra por los dos tratamientos y el factor de corrección como la gran media del encogimiento individual. Es importante mencionar que las comparaciones fueron hechas entre los diámetros de los oocitos obtenidos de los mismos especímenes.

Para contrastar los resultados y garantizar repetitividad y precisión de las estimaciones se construyeron las curvas de calibración entre el diámetro de los oocitos, obtenido a partir de preparaciones fijadas y el diámetro de oocitos a partir de mediciones en los cortes histológicos. Así mismo se construyó la curva de calibración entre el diámetro de los oocitos obtenido a partir de preparaciones fijadas y el diámetro de oocitos en preparaciones histológicas corregidas por proceso histológico. Para contrastar los resultados se hizo una comparación de pendientes de acuerdo con lo propuesto por Meseguer Lloret, (2016). Donde la pendiente obtenida se compara contra una pendiente $\beta = 1$.

3.-Comparación entre métodos para estimar la fecundidad parcial individual (*Fpi*).

La estimación de la *Fpi* se llevó a cabo a partir conteo del número de oocitos que conforman el grupo de la moda más avanzada, para lo cual se hizo una selección de las hembras maduras no desovantes sin atresia de acuerdo con los criterios de Hunter y Macewicz (1980).

La estimación de la *Fpi* se hizo con la implementación de tres métodos diferentes: a) el Método Gravimétrico asistido por procesamiento digital de imágenes, b) el

estereológico de Weibel y Gomez y c) el Disector Físico, las estimaciones se hicieron con los mismos ejemplares para los tres métodos.

Para estimar la **Fpi**, los índices de atresia α y su efecto en la producción de oocitos, se aplicaron técnicas de procesamiento digital de imagen. Se trata de un conjunto de técnicas que operan sobre la representación digital de una imagen. El objetivo es destacar algunos de los elementos que conforman la imagen, de modo que se facilite su posterior análisis. La aplicación de estas técnicas facilita la obtención de información cuantitativa contenida en la imagen, de manera rápida y confiable. Los detalles de estas técnicas se encuentran contenidos en Valdez-Montiel (2012).

Para la estimación de la fecundidad parcial previamente se calculó el tamaño de muestra, mediante el siguiente modelo propuesto por Thigpen (1987), citado por Hunter *et al.* (1992):

$$n - 1 = \frac{\left(\frac{1 - r^2}{r^2}\right)}{CV(b)^2}$$

Dónde:

n = Número de hembras necesarias para la estimación de la fecundidad parcial

$CV(b)^2$ = Coeficiente de variación para el coeficiente de la regresión (fecundidad y el peso libre de gónadas), el cual se asume con un valor de 0.01.

r^2 = Coeficiente de determinación.

Para obtener el coeficiente de determinación fue necesario hacer la regresión entre el peso del pez eviscerado y la fecundidad. Esta regresión se hizo con las estimaciones de **Fpi** obtenidas por personal del Laboratorio de Morfofisiología del CICIMAR-IPN a través del método de gravimétrico asistido por procesamiento digital de imágenes.

La selección de los organismos se hizo al azar aplicando una utilidad generadora de números aleatorios.

Para la estimación de la fecundidad parcial por medio del método gravimétrico asistido por procesamiento digital de imágenes se seleccionaron a las hembras en estadio de madurez avanzada, caracterizadas por la presencia de oocitos con núcleo migratorio, células columnares en la capa granulosa y/o proteólisis del vitelo. Las hembras que presentaron folículos postovulatorios de cualquier edad o con estadios de atresia, no fueron incluidas para la estimación de la fecundidad parcial, de acuerdo a los criterios propuestos por Hunter y Macewicz (1980).

De cada hembra se extrajeron 3 alícuotas de la región media de cualquiera de los dos ovarios, una de la parte dorsal, otra de la región central y una más de la región ventral. Una vez tomadas las alícuotas se procedió a eliminar el exceso de formol y la capsula del ovario para evitar sobrepeso. De cada alícuota se obtuvo un peso aproximado de 0.05g, con una balanza analítica (sensibilidad de 0.001g). El material ovárico de cada sub-muestra se disgregó sobre un porta objetos, agregándose previamente una o dos gotas de glicerina-agua (1:1). La muestra fue cubierta por un cubreobjetos evitándose la formación de burbujas. Una vez montada la preparación se procedió a la captura de la imagen con luz transmitida, utilizando un estereomicroscopio (Stemi 2000c Carl Zeiss) y una cámara digital AxioCam MRC. La obtención de las imágenes digitales se con el software AxioVision, Versión 4.1. El programa fue calibrado micrométricamente, proceder con la medición y conteo de los oocitos. Después se calcularon las medidas de dispersión para estos datos (media, desviación estándar y varianza). Se graficó la distribución de diámetros de los oocitos en la muestra, se identificó el grupo de la moda más avanzada, y se contabilizo el número de oocitos pertenecientes a este grupo. Posteriormente se procedió a la estimación de la fecundidad parcial por medio del siguiente modelo:

$$Fpi = \frac{(Wg) * (NOV)}{Wn}$$

Dónde:

Fpi = Fecundidad parcial individual.

Wg = Peso de la gónada

NOV = Número de oocitos de la muestra

Wn = Peso de la muestra.

Para la estimación de la Fpi por el método estereológico de *Weibel y Gomez* se utilizó el mismo grupo de hembras empleadas en la estimación de Fpi por el método gravimétrico. El número de oocitos para estimar la Fpi se obtuvo con el modelo propuesto por Weibel y Gómez (1962) el cual está basado en la aplicación del principio de Delesse (1847), utilizando el siguiente modelo:

$$Nv = \left(\frac{K}{\beta}\right) \left(\frac{Na^{3/2}}{Vi^{1/2}}\right)$$

Dónde:

Nv = Número de oocitos intraováricos por unidad de volumen.

β = Coeficiente de forma de los oocitos. El cual se fijó en 1.455 por la forma esférica de los oocitos.

Na = Número de oocitos por unidad de área.

Vi = Fracción de volumen ocupada por los oocitos.

K = Coeficiente de distribución de tallas de los oocitos. El cual fue determinado para cada gónada como sigue:

$$k = \left(\frac{m_3}{m_1}\right)^{3/2}$$

$$m_1 = \frac{(D_1 + D_2 + \dots + D_N)}{n}$$

$$m_3 = \frac{((D_1)^3 + (D_2)^3 + \dots + (D_n)^3)^{1/3}}{n}$$

Dónde:

m_1 = Media del diámetro de los oocitos con núcleo evidente, presentes en el corte.

m_3 = Raíz cubica de la distribución de diámetros de los oocitos con núcleo evidente.

D = Diámetro individual de oocitos con núcleo evidente.

n = Número de partículas contadas en el corte.

En el caso del método “3D” para estimar la **Fpi** se utilizó el disector físico como unidad de muestreo (Sterio, 1982, Gundersen, 1986;). El disector físico consta de dos cortes histológicos seriados, en donde, la distancia entre ellos es de $1/4$ o $1/3$ del diámetro de las partículas que se analizan. El corte superior corresponde al plano de referencia y el corte inferior al plano de búsqueda. La profundidad del disector se determinó a partir del diámetro máximo de los oocitos de interés, en este caso el diámetro máximo de los oocitos en estadio en madurez final. En la figura 2 se expone un ejemplo simplificado de este procedimiento, el cual representa el Disector Físico de 1 cuadrante.

Posteriormente se toman micrografías de ambos cortes histológicos, estas micrografías se alinean, mediante la implementación de un software para análisis digital de imagen, sobre las micrografías se identifican las partículas de interés de acuerdo a criterios morfológicos, posteriormente a las micrografía se les sobrepone una rejilla de cuadrantes de tamaño conocido distribuidos equidistantemente. Por números aleatorios se seleccionan los cuadrantes a utilizar en la estimación, posteriormente se comparan ambos planos (referencia y búsqueda) y se contabilizan aquellos perfiles de oocitos que no aparecen repetidos en ambos cortes. En la tabla I

se observa esquemáticamente el procedimiento para la aplicación de Método del disector Físico.

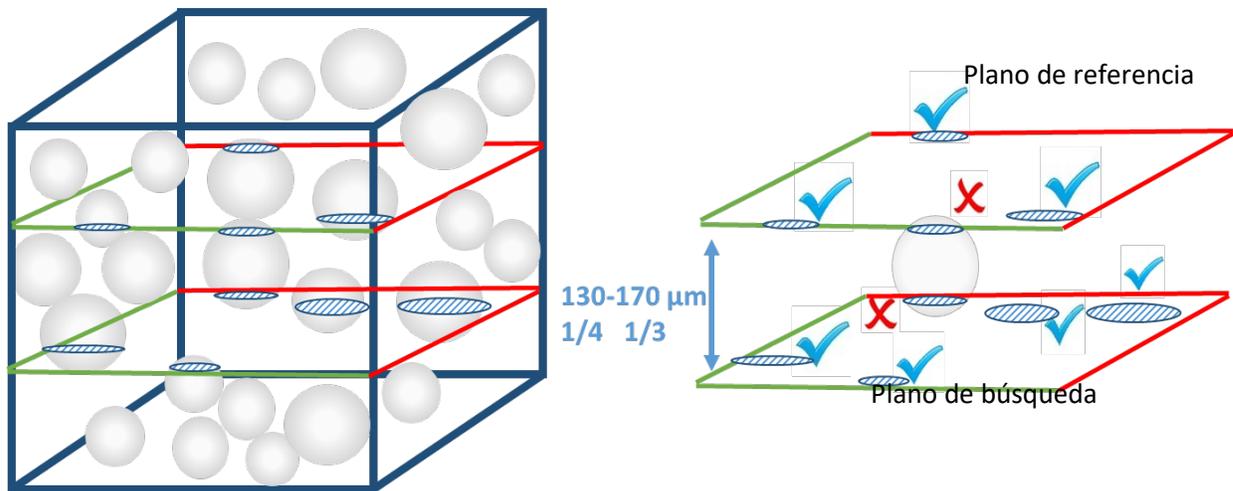
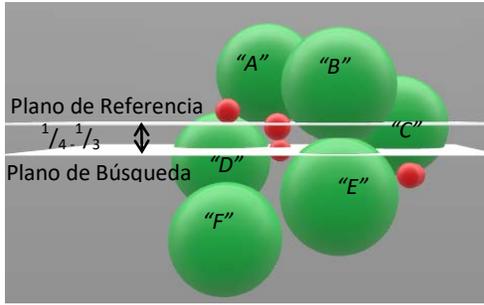


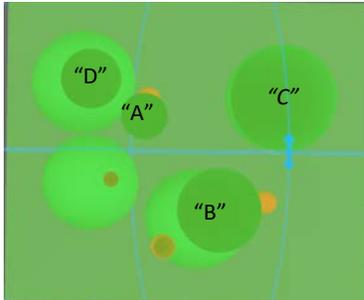
Figura 2.- Ejemplo Simplificado del método del Disector Físico.

Tabla I.- Representación simplificada del proceso del Disector Físico

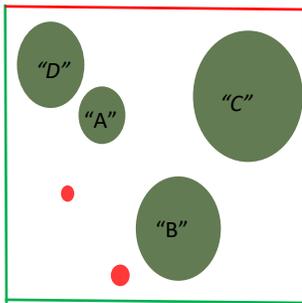
Representación	Descripción
	<p>Representación tridimensional de un grupo de partículas, la cual es un ejemplo simplificado de la distribución de oocitos en el ovario de <i>S. sagax</i>. Las esferas en verde representan las partículas de interés a ser estimadas mediante el método del disector físico.</p>
	<p>Representación tridimensional de un grupo de partículas, en este panel se observa, los dos niveles de corte que se han de aplicar para la construcción del disector físico. El corte superior llamado Plano de búsqueda y llamado plano de referencia. La separación entre estos dos planos debe ser igual a $\frac{1}{4} - \frac{1}{3}$ del diámetro promedio de las partículas a contabilizar. En este ejemplo esferas verdes.</p>



Representación tridimensional de un grupo de partículas, cortadas por ambos planos (“Referencia” y “Búsqueda”)

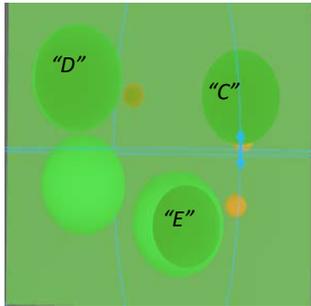


Vista cenital de las partículas cortadas por el plano de referencia. En el presente ejemplo la sombra verde oscuro representa el perfil generado al cortar las esferas “D”, “A”, “B”, “C”, en verde claro se representan partículas que no fueron cortadas por el plano y que se encuentran contiguas a la partícula cortada.

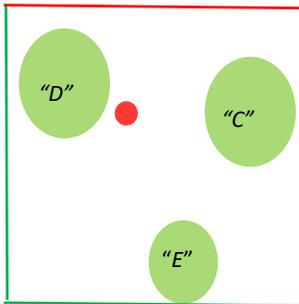


Perfiles generados al cortar las esferas “D”, “A”, “B”, “C”, las cuales se encuentran enmarcadas dentro de un cuadrante, la cual es la unidad de muestreo utilizada por el método del disector. Las líneas rojas representan líneas de exclusión y las verdes líneas de inclusión.

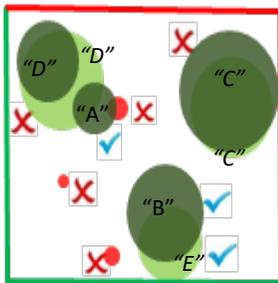
En el caso de que los perfiles estén cortando la línea roja las partículas serán descartadas de la estimación, caso contrario a las partículas que crucen las líneas verdes.



Vista cenital de las partículas cortadas por el plano de Búsqueda. En el presente ejemplo la sombra verde oscuro representa el perfil generado al cortar las esferas "D", "C", "E".



Vista cenital de las partículas cortadas por el plano de referencia. En el presente ejemplo la sombra verde oscuro representa el perfil generado al cortar las esferas "D", "C", "E", en verde claro se representan partículas que no fueron cortadas por el plano y que se encuentran contiguas a la partícula cortada.



Suma de matrices de los perfiles generados por los planos de *Referencia* y *Búsqueda*. El procedimiento para seleccionar las partículas para la estimación del número de partículas por unidad de volumen consiste en identificar las partículas en ambas secciones, si las partículas aparecen repetidas en ambas, serán descartadas de la estimación, caso contrario si no aparecen repetidas en ambas.

En el caso de la partícula "A", esta es considerada dentro de la estimación debido a que solo fue cortada por el plano de *Referencia*.

En el caso de las partículas "B" y "E" ambas partículas deben ser incluidas en la estimación debido a que son perfiles que corresponden a

dos partículas diferentes.

En el caso de las partículas “**D**” y “**C**” ambas partículas serán descartadas de las estimaciones debido a que fueron cortadas tanto por el plano de *Referencia* como el de *búsqueda*.

El número de células por unidad de volumen fue estimado con el siguiente modelo:

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

Dónde:

$estNv$ = Número de oocitos por unidad de volumen.

a/f = Área de la superficie del corte.

h = Profundidad del disector, es la separación entre los cortes de referencia y de búsqueda que definen el disector.

Q = Número de oocitos contados en todos los cuadrantes del disector.

p = Número de cuadrantes muestreados en el disector.

3.1.-Comparación de la *Fpi* obtenida por los tres métodos.

Una vez estimada la ***Fpi*** por medio de las tres técnicas descritas se obtuvo la estadística descriptiva de los datos y se hizo la comparación de los resultados obtenidos. Debido a que los datos se apegaron a los supuestos de normalidad y homocedasticidad se procedió a la comparación mediante un análisis de varianza.

Con la finalidad de analizar la precisión y reproducibilidad de los resultados obtenidos entre los diferentes métodos se elaboraron curvas de calibración. Para esto se hicieron pruebas de comparación de pendientes para cada una de las estimaciones, donde la referencia fue una pendiente de 45° ($\beta = 1$) de acuerdo a lo propuesto por

Meseguer Lloret (2016). El método gravimétrico se usó como referencia para todas las estimaciones de **Fpi**.

Una vez comparados estadísticamente los resultados se hizo un análisis de las ventajas y desventajas de cada método, con el objetivo de seleccionar el método más adecuado para la estimación de los índices de atresia, **Fpi** y fecundidad parcial individual real.

4.-Estimacion de los índices de atresia.

Para la estimación del efecto de la atresia se emplearon los indicadores descritos por (Kurita *et al.*,2003), Prevalencia de atresia α , Intensidad relativa individual de atresia α e Intensidad relativa poblacional de atresia α .

4.1.-Prevalencia de atresia

Se estimó la prevalencia de atresia definida como la proporción de hembras maduras no desovantes que presentan atresia α en los oocitos en madurez final, respecto al total de hembras maduras no desovantes analizadas (Kurita *et al.*,2003):

$$PA\alpha = \left(\frac{\sum_{i=1}^n ma\alpha_{ij}}{\sum_{i=1}^n ma_{ij}} \right) 100$$

Dónde:

$PA\alpha$ =Prevalencia de atresia α en hembras maduras no desovantes.

$\sum_{i=1}^n ma_{ij}$ =Frecuencia mensual de las hembras maduras no desovantes totales desde la hembra $i = 1$ hasta n . del mes j

$\sum_{i=1}^n ma\alpha_{ij}$ =Frecuencia mensual de las hembras maduras no desovantes con presencia de atresia α desde la hembra $i = 1$ hasta n . del mes j .

4.2.- Intensidad relativa individual de atresia α .

Se estimó la intensidad relativa de atresia definida como la proporción de oocitos intraováricos en estadios de madurez final que presentaron atresia α , referido al

número total de oocitos en un tamaño de muestra definido, por hembra (Kurita, *et al.*,2003). Para la estimación de este índice se utilizó el método de Weibel y Gomez para el cálculo de las frecuencias de oocitos en etapa de madurez y atresia. Esto es posible dado que los oocitos en estadio de atresia alfa en oocitos con vitelo presentan una distribución homogénea dentro de la gónada, además de un tamaño y forma similar a los oocitos en madurez avanzada, con los cuales se calibraron los métodos estereológicos descritos en el presente trabajo.

$$IRA\alpha = \left(\frac{\sum_{i=1}^n Oma\alpha_{ij}}{\sum_{i=1}^n TOG_{ij}} \right)$$

Dónde:

$IRA\alpha$ = Intensidad relativa de atresia α .

$\sum_{i=1}^n Oma\alpha_{ij}$ = Frecuencia de oocitos intraováricos con atresia α desde la hembra $i=1$ hasta la hembra n del mes j .

$\sum_{i=1}^n TOG_{ij}$ Frecuencia de oocitos intraováricos (en madurez y en atresia) desde la hembra $i=1$ hasta n del mes j .

4.3.- Intensidad relativa poblacional de atresia α .

Se calculó la intensidad relativa poblacional de atresia definida como el producto de la media geométrica de la intensidad relativa individual de atresia, es decir sólo de las hembras con atresia α , por la prevaencia de atresia (Kurita, *et al.*,2003).

$$IRP = PA\alpha * \sqrt[n]{IRA\alpha_1 * IRA\alpha_2 \dots * IRA\alpha_n}$$

Dónde:

IRP= Intensidad relativa de atresia a nivel poblacional

5.- Estimación de la fecundidad parcial individual real (\widehat{Fpi} .)

La fecundidad parcial individual real (\widehat{Fpi} .) para el presente trabajo es definida como el número de oocitos producidos por hembra por desove parcial, menos la reabsorción

de oocitos intraováricos con incidencia de atresia α . En este caso el conteo del número de oocitos en estadio de madurez y atrésicos se hizo mediante el método de Weibel y Gomez.

$$\widehat{Fpl.} = \left(\left[\left(\sum NoV_i \right) - \left(\sum NoV\alpha \right) \right] * Vg \right)$$

Dónde:

$\widehat{Fpl.}$ = Fecundidad parcial individual real

$\sum NoV_i$ = Número de oocitos intraováricos maduros por unidad de volumen

$\sum NoV\alpha$ = Número de oocitos intraováricos en estadio de atresia α por unidad de volumen.

Vg =Volumen del ovario.

5.1.- Comparación de la estimación de la Fpi y $\widehat{Fpl.}$.

Una vez estimada la Fpi y la fecundidad parcial real $\widehat{Fpl.}$. Se procedió a comparar estadísticamente los resultados mediante un análisis de varianza a fin de evidenciar el efecto de la atresia ovárica en las estimaciones de fecundidad.

Resultados.

1.- Caracterización

A partir del análisis histológico de las gónadas de *S. sagax*, se detectó un máximo de reproducción entre los meses de enero y abril, meses durante los cuales se alcanzan las mayores frecuencias de organismos en estadio de madurez (vitelogénesis avanzada, proteólisis de vitelo, núcleo migratorio, hidratación inicial e hidratación final), Durante el mes de enero la frecuencia de hembras activas, hembras asociadas al desove 90h. antes y 90hr después de que este ocurra, fue baja (31%), esta frecuencia se incrementó para los meses de febrero hasta alcanzar el 76% y en marzo llegó al 94%, Sin embargo, para el mes de abril la frecuencia de hembras activas decayó a un 47% lo cual es un indicador del fin del pico reproductivo. Lo anterior evidencia que durante febrero y marzo ocurrió el máximo de puesta en la temporada de puesta de la sardina monterrey en 2007 (Fig.2). Durante el pico de la temporada de puesta la frecuencia de atresia permaneció con valores bajos, solo se incrementó durante el mes de abril, mes donde se obtiene un decremento de la frecuencia de hembras activas.

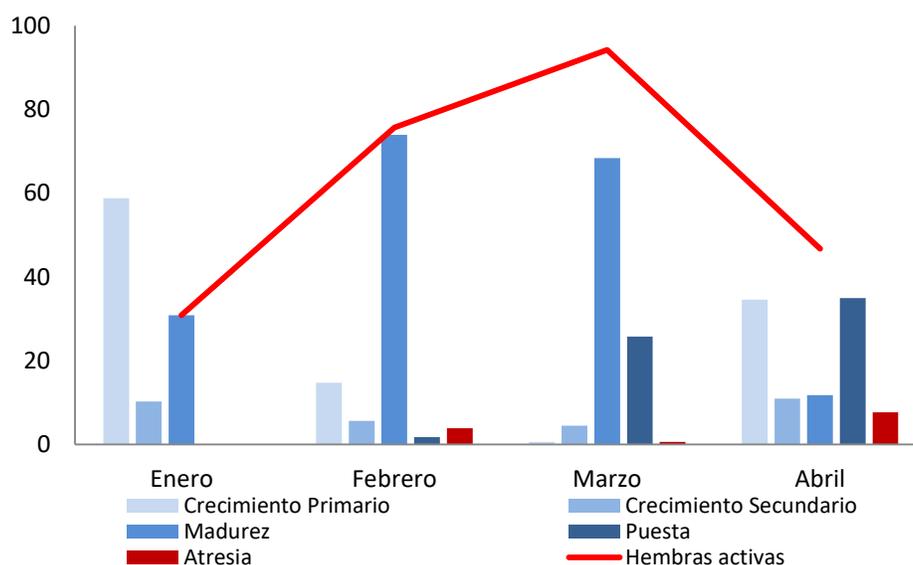


Figura 3.- Frecuencia observada de los diferentes estadios ováricos a lo largo de la temporada de puesta 2007 de la sardina monterrey (*S. sagax*) en la costa occidental de Baja California.

2.-Estimación del encogimiento de tejido por proceso histológico.

El valor del tamaño de muestra para estimar el encogimiento de los oocitos del grupo de la moda más avanzada fue de 1,511.31. Dado que el proceso digital de imágenes reduce sustancialmente el costo del proceso, en horas persona⁻¹, se contabilizaron todos los oocitos de la moda más avanzada en el material fijado y todos los oocitos en estadio de madurez final en los cortes histológicos. Este sobremuestreo significó al menos el 44% de oocitos del tamaño de muestra calculado.

El intervalo observado entre los diámetros de los oocitos en estadio de madurez final, estuvo entre 390.1 y 575.6 μm para el caso del material procesado histológicamente; y para el caso del material fijado de 452.0 y 598.5 μm , la diferencia promedio fue calculada en 7.57 %. Esta diferencia fue significativa, como se observa en el análisis de varianza ***p-Valor = 0.002***. Es evidente la reducción del diámetro medio de los oocitos, por efecto del proceso histológico (Fig. 3), la diferencia en el diámetro introduce un sesgo en la estimación de la densidad de oocitos en el ovario.

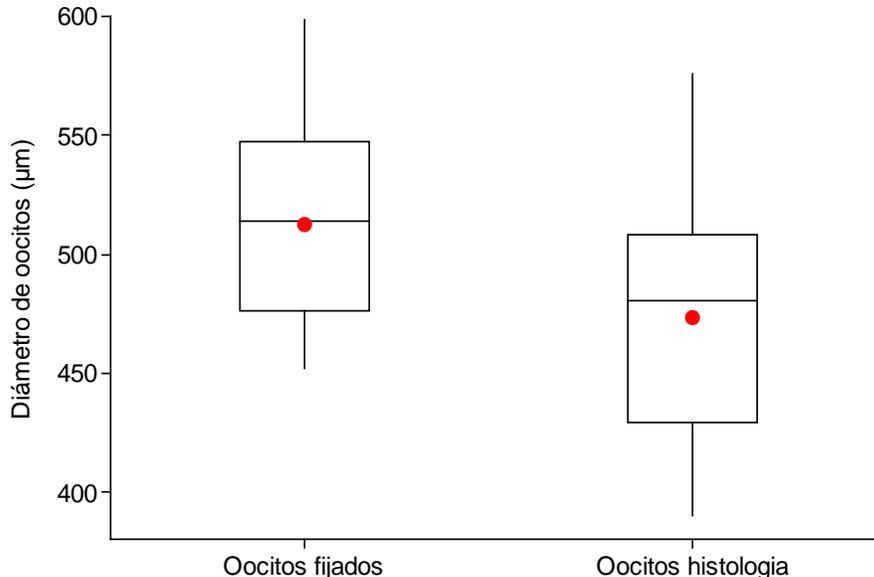


Figura 4.- Comparación de las distribuciones de diámetros de los oocitos de *S. sagax* obtenidos a partir de mediciones de oocitos fijados en preparaciones en fresco vs. diámetros de oocitos obtenidos en cortes histológicos. $\alpha = 0.05$, $F = 10.22$, p -Valor = 0.002 y $gl = 53$.

Se corrigieron los diámetros de los oocitos medidos en el material histológico, aplicándose la corrección del diámetro por encogimiento. Con esta corrección no se encontraron diferencias estadísticamente significativas como se observa en el análisis de varianza **p-Valor = 0.81** (Fig. 4).

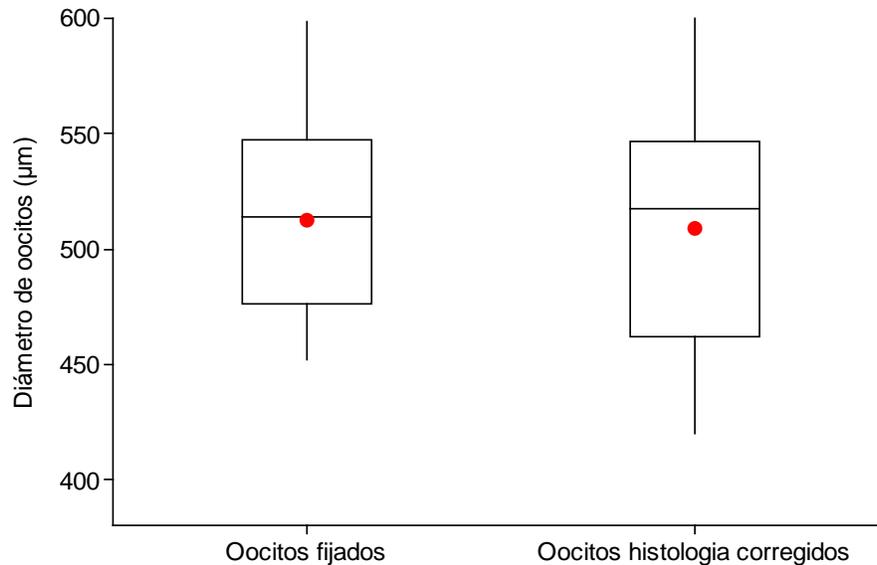


Figura 5.- Comparación de las medias de diámetros de los oocitos de *S. sagax* medidos en en preparaciones fijadas en fresco vs. diámetros de oocitos medidos en cortes histológicos y corregidos por encogimiento por efecto de la técnica histológica. $\alpha = 0.05$, $F = 0.06$, $p\text{-Valor} = 0.81$ y $gl = 53$

Con los datos obtenidos se construyeron dos curvas de calibración para el diámetro de los oocitos obtenidos por mediciones en material fijado y por mediciones sobre cortes histológicos, una con los datos observados y otra con la corrección por encogimiento (Figura 5).

La regresión entre el diámetro obtenido a partir de preparaciones de los oocitos fijados enteros y el diámetro de oocitos obtenidas a partir de mediciones en cortes histológicos (Fig.5A), tuvo un coeficiente de determinación de $r^2 = 67\%$, la pendiente del modelo $\beta_{ob} = 0.907$, la cual no es significativamente diferente de 1. ($T_{cal} = 0.73$ $T'_{cal} = 2.06$ $\alpha = 0.05$ $\beta = 1$)

Una vez hecha la corrección del diámetro por efecto de la reducción del 7.57%, por el efecto de la técnica histológica, la regresión entre el diámetro de los oocitos enteros de las preparaciones en fresco y el diámetro obtenido a partir de los cortes histológicos corregido (Fig. 5B) tuvo un coeficiente de determinación de $r^2 = 67.1\%$, la pendiente del modelo = 0.976, la pendiente del modelo $\beta_{ob} = 0.975$ la cual no es significativamente diferente de 1 ($T_{ca} = 0.18$ $T'_{ca} = 2.06$ $\alpha = 0.05$ $\beta = 1$)

Después del análisis de los resultados se observa que los valores de los diámetros se encuentran sesgados hacia las determinaciones obtenidas a partir del material fijado, se obtienen diámetros mayores en las mediciones obtenidas a partir de las mediciones en material fijado.

Si bien no se observó un cambio importante en el coeficiente de determinación entre la regresión en los diámetros corregidos con respecto a los diámetros sin corregir, si se puede observar una mejora en el valor de la pendiente, lo cual es la evidencia de una reducción del sesgo introducido por el proceso histológico.

Se observa una variación en la distribución de los valores de los diámetros de los oocitos alrededor de la línea de pendiente en la figura 5B, esta puede deberse a que para la estimación del encogimiento se usó un grupo de hembras en el estadio de madurez avanzada, el cual incluye tres etapas diferentes, células altas, proteólisis y núcleo migratorio, las cuales tiene diferentes cantidades de agua. Otra explicación para esta variabilidad es debido a la variación en el tamaño de los oocitos entre las diferentes hembras analizadas, es decir cada hembra produce huevos de diferente tamaño.

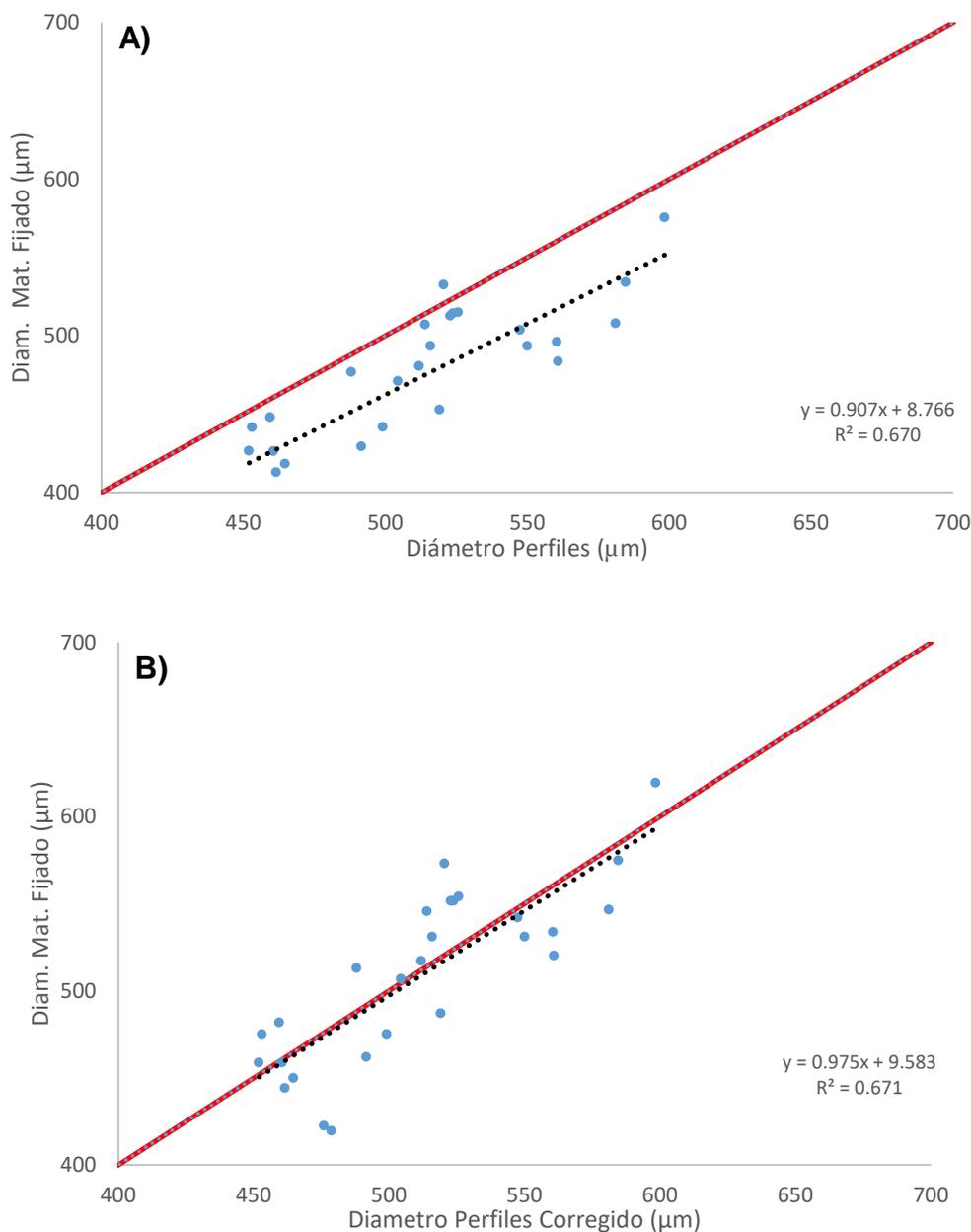


Figura 6.- Curvas de calibración del diámetro promedio individual de los oocitos intraováricos en el estadio de madurez final de la sardina monterrey (*S. sagax*). Las estimaciones que se comparan se obtuvieron por micrometría en preparaciones de material fijados en formol (en el eje y) contra estimaciones obtenidas a partir de perfiles estereométricos en preparaciones histológicas (en eje x). En ambos casos se muestra una recta con pendiente $\beta = 1$ (línea roja) como referencia. En la gráfica (A) se muestran los datos sin aplicar la corrección por encogimiento y en la (B) los datos de los perfiles se han corregido por el encogimiento (7.57%).

3.-Comparación métodos para estimar la *Fpi*.

Para obtener el tamaño de muestra para la estimación *Fpi* se tomaron como base los datos parametros de la regresion entre la *Fpi* y el peso libre de gónadas presentado por Torres-Villegas (2008). Los datos de *Fpi* fueron obtenidos con el método gravimétrico en el grupo de las hembras maduras no desovantes.

En la Tabla II se muestran los parámetros de la regresión entre la fecundidad parcial y el peso libre de gónadas utilizados para la estimación del tamaño mínimo de muestra utilizado en la comparación de la *Fpi* entre el método gravimétrico y el estereológico. El valor estimado fue $n= 27$ y las hembras a utilizar en las estimaciones de fecundidad por los tres métodos fueron elegidas al azar asignándoles números aleatorios.

Tabla II.- Parámetros para la estimación del tamaño mínimo de muestra.

Predictor	Coefficiente	Desviación estándar	t-ratio	p
Fecundidad parcial	6824	2021	3.38	0.001
Peso libre de gónada	84.92	32.27	2.63	0.010
S =3742	$r^2 = 0.789$		$r^2(adj) = 0.87$	

Los resultados de *Fpi* obtenidos por el método gravimétrico asistido por procesamiento digital de imágenes, se muestran agrupados por mes en la Tabla III. Se observa una tendencia al aumento del número de oocitos producidos por hembra al avanzar la temporada de puesta, este aumento de la fecundidad se puede relacionar al aumento en la frecuencia de hembras activas.

Tabla III.- Valores promedio de fecundidad parcial individual de *S. sagax* obtenido mediante la aplicación del método Gravimétrico asistido por Procesamiento Digital de Imágenes., durante la temporada de pesca 2007, tomadas a bordo de la flota sardinera con base en Ensenada BC.

	Enero	Febrero	Marzo
Promedio	9277	10725	13257
Desviación Estándar	3841	1805	2289
n	5	8	14

En la aplicación del método de Weibel y Gomez, se hicieron dos estimaciones de la *Fpi*, esto fue, con la finalidad de contrastar los resultados y valorar el efecto del encogimiento del diámetro de los oocitos por efecto de la técnica histológica. La primera estimación con los datos observados y, la segunda se hizo con los datos corregidos con 7.57%. Los valores obtenidos se presentan en la Tabla IV. Al igual que los resultados obtenidos por el método gravimétrico se observa una tendencia a incrementar la fecundidad conforme se avanza en la temporada de puesta, estos resultados son consistentes con lo observado en la frecuencia de hembras activas, la cual sigue la misma tendencia. En los datos estimados por los tres métodos hasta aquí descritos, se observan valores más altos de desviación estándar durante el mes de enero, lo cual puede estar influenciado por un lado por el poco número de hembras consideradas por el análisis en este mes. Otra posible explicación que no todas las hembras inician en el proceso de reproducción al mismo tiempo, y por tanto las hembras que iniciaron antes pueden producir más huevos que las que apenas inician, y debido a que el proceso reproductivo inicia en diciembre, durante enero puede haber presencia de hembras que apenas inician en la reproducción así como hembras que iniciaron el proceso con anterioridad en un óptimo reproductivo.

Tabla IV.- Valores de fecundidad parcial individual de *S. sagax* obtenidos mediante la aplicación del método estereológico de Weibel y Gomez con los datos observados y con los datos corregidos con 7.57% por efecto de proceso histológico, para la temporada de pesca 2007, tomadas a bordo de la flota sardinera con base en Ensenada BC.

Método	Parámetro	Enero	Febrero	Marzo
Weibel y Gomez	Promedio	8828	10129	12299
	Desviación Estándar	4174	1991	2834
Weibel y Gomez corregido	Promedio	9496	10896	13231
	Desviación Estándar	4490	2142	3049
	n	5	8	14

La comparación de los datos de *Fpi* obtenidos por el método gravimétrico y el método de Weibel y Gomez se hizo con todos los valores. Además, el análisis de varianza se hizo para los valores obtenidos por estereometría con los datos observados y con los corregidos. Los resultados se observan en Tabla V.

Al aplicar el análisis de varianza entre ambas estimaciones, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla V.- Resultados de los análisis de varianza de la fecundidad de la sardina monterrey (*S. sagax*) donde se comparan los datos obtenidos con el método gravimétrico, el método estereológico y el método gravimétrico el estereológico corregido.

Comparación fecundidad parcial individual	Media	Intervalo	F-Valor	p-Valor
Método Gravimétrico	$\bar{X} = 11,770$	[8857 , 14683]	0.84	0.362
Método de Weibel y Gomez	$\bar{X} = 11,014$	[7881 , 14147]		
Método Gravimétrico	$\bar{X} = 11,770$	[8857 , 14683]	0.01	0.928
Método de Weibel y Gomez (Corregido)	$\bar{X} = 11,847$	[8477 , 15217]		

En ambos casos no se encontraron diferencias significativas entre las estimaciones (Figs. 7 y 8). En el caso de la estimación por estereología con los datos observados se observa una estimación inferior de la **Fpi** con respecto a la obtenida por gravimetría. Al momento de corregir la estimación por el efecto de encogimiento se observa un ajuste mejor, en las medias, además de un ligero incremento en la desviación estándar de las estimaciones, este incremento no influencia el hecho de no encontrar diferencias significativas.

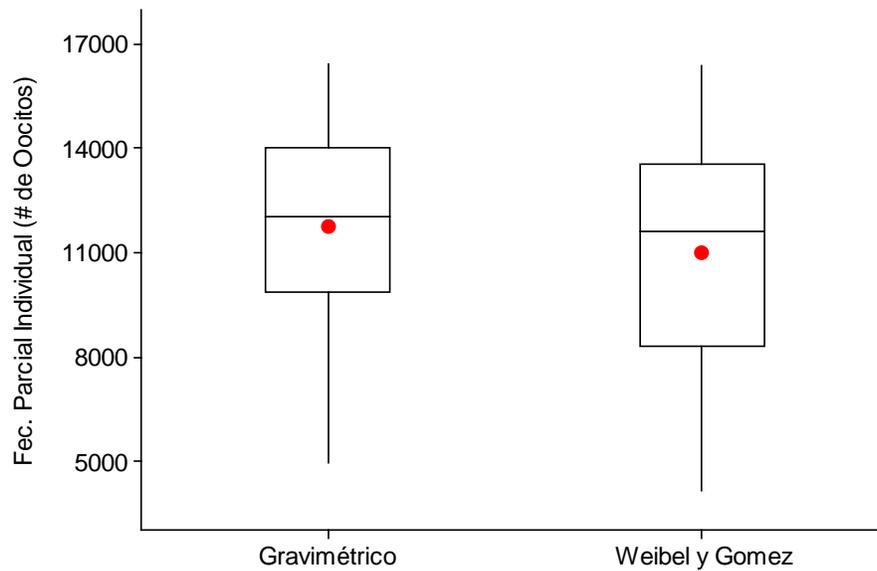


Figura 7.- Comparación de las estimaciones de fecundidad parcial de *S. sagax* obtenidas con el Método Gravimétrico vs. Estimaciones con el método de Weibel y Gomez. $\alpha = 0.05$, $F = 0.06$, p-Valor = 0.36 y $gl = 53$.

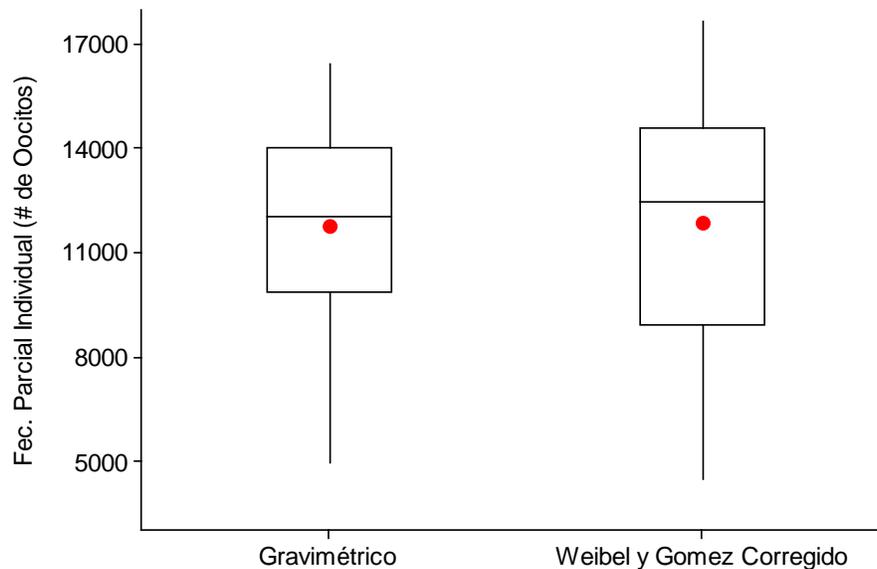


Figura 8.- Comparación de las estimaciones de fecundidad parcial de *S. sagax* obtenidas con el Método Gravimétrico y el Estereológico de Weibel y Gomez corregido considerando el encogimiento producido por el efecto de la técnica histológica. $\alpha = 0.05$, $F = 0.01$, p-Valor = 0.928 y $gl = 53$.

La estimación de la *Fpi* con el método del disector físico se hizo con dos profundidades, el primero con una profundidad de $\frac{1}{4}$ (130 μ m) del diámetro de los oocitos y el segundo con una profundidad de $\frac{1}{3}$ (170 μ m) del diámetro. Los cálculos para estimar la *Fpi* se hicieron con el volumen de los ovarios corregidos por el factor de encogimiento antes descrito. Los resultados se presentan en Tabla VI.

Tabla VI.- Valores de fecundidad parcial individual de *S. sagax* obtenido mediante la aplicación del Disector físico a 130 y 170 μ m, durante la temporada de pesca 2007, en Ensenada BC.

		Enero	Febrero	Marzo	
Disector	130 μ m	Promedio	9641	10554	12717
		Desviación Estándar	4136	1442	2193
		n	5	8	14
Disector	170 μ m	Promedio	8016	9391	10644
		Desviación Estándar	4136	1442	2193
		n	5	8	14

Al comparar los resultados obtenidos por el disector 130 μ m contra aquellos obtenidos con el método de referencia (gravimétrico) se observa una pequeña diferencia entre las medias y cierto desfasamiento de los intervalos, no suficientes para encontrar diferencias estadísticas significativas entre los resultados de estos dos métodos ***p-Valor = 0.73*** (Fig. 8). Por el contrario, en el caso de la comparación entre el disector de 170 μ m y los resultados obtenidos por el método gravimétrico, se pone en evidencia una diferencia significativa. ***p-Valor = 0.008*** (Fig. 9). En ambos casos la diferencia observada significativa o no; demuestran que los resultados con el disector físico tienen una tendencia hacia valores inferiores a los obtenidos con el método gravimétrico.

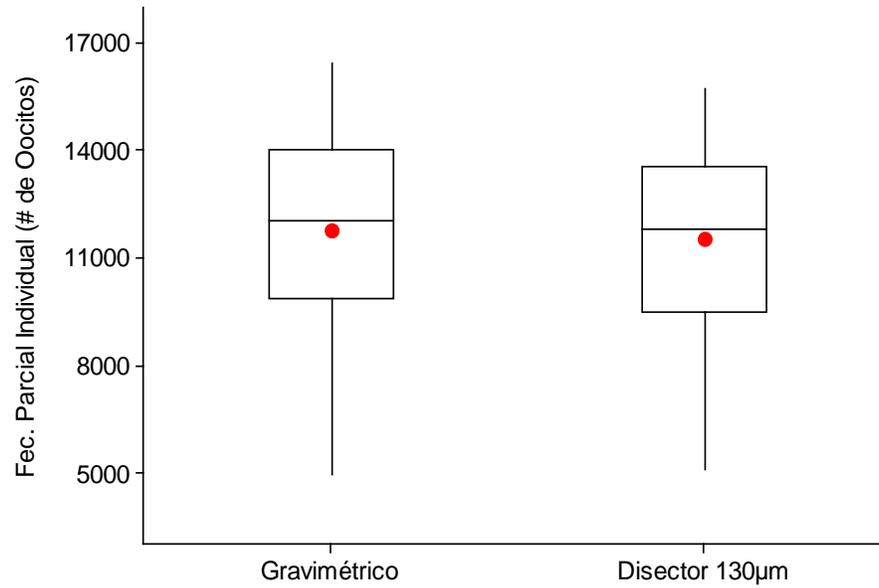


Figura 9.- Comparación de la estimación de fecundidad parcial individual de *S. sagax* obtenida con el Método Gravimétrico, vs. el Disector 130µm. $\alpha = 0.05$, $F = 0.12$, p -Valor = 0.73 y $gl = 53$.

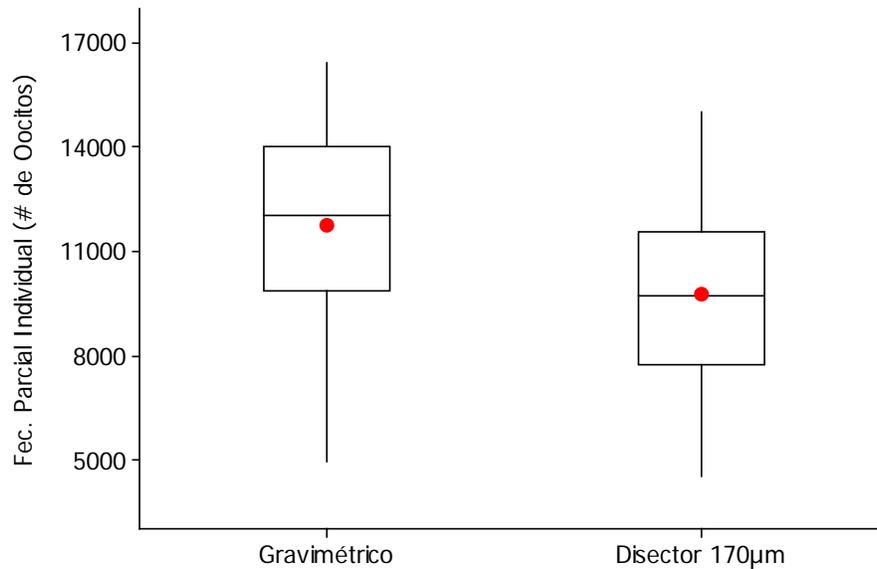


Figura 10.- Comparación de la estimación de fecundidad parcial individual de *S. sagax* obtenida con el Método Gravimétrico, vs. el Disector 170µm. $\alpha = 0.05$, $F = 7.59$, p -Valor = 0.008 y $gl = 53$.

Los datos obtenidos indican que hay un sesgo en los resultados de los disectores, más evidente en el disector de 170 μm , es decir, se obtienen estimaciones más bajas que con el método de referencia.

Al analizar los perfiles de los oocitos presentes en cada uno de los disectores se encontró la dificultad para establecer si dos perfiles ubicados en la misma coordenada " x, y " de un disector corresponden a una sola partícula, o a dos distintas, esto impacta el número de partículas que se contabilizan para estimar la fecundidad.

Para probar si esta característica es la fuente del sesgo observado, se identificaron los perfiles que presentaron el conflicto en cada uno de los cuadrantes empleados para ambos disectores por hembra analizada. En los eventos de conflicto se estimó la distancia entre ambos perfiles por partícula y se compararon con la distancia de cada uno de los disectores empleados.

Con la finalidad de parametrizar lo anterior se construyó un sistema con una circunferencia, esto como representación en 2 dimensiones de una esfera, cuyo centro se colocó en medio de un sistema de ejes x, y . El radio asignado a la circunferencia fue el valor del diámetro promedio de los oocitos en estadio de madurez avanzada. A partir del área de los perfiles de las partículas en conflicto, se obtuvo el diámetro de cada perfil y con este diámetro se intersectó la circunferencia con dos planos paralelos de corte, que representan los perfiles. El centro de estos planos se colocó en el eje y con lo que se generó un sistema de triángulos rectángulos, donde la hipotenusa es el diámetro del oocito en madurez avanzada. Los catetos opuestos a los ángulos θ_1 y θ_2 (segmentos \overline{eb} y \overline{dc}) corresponden a $\frac{1}{2}$ del diámetro de los perfiles. La distancia del centro de la circunferencia al punto donde cada perfil corta el eje y son los catetos adyacentes (segmentos \overline{ae} y \overline{ad}); estos segmentos se calculan con el teorema de Pitágoras (Fig.10)

Como no es posible saber si los planos de disector se encuentran en un mismo hemisferio, se calcularon las distancias en dos condiciones, a) cuando ambos perfiles se encuentran en el mismo hemisferio, en cuyo caso la separación entre los perfiles

Con el sistema propuesto se recalcularon los valores de **Fpi** para los dos disectores. Al comparar los resultados obtenidos por el disector corregido con profundidad de 130µm y el método gravimétrico, se observa un mejor ajuste de las medias de ambas estimaciones. Si bien se observa un ligero incremento en la desviación estándar en los resultados de disector de 130 corregido, esto no es la causante de no encontrar diferencias estadísticas significativas **p-Valor = 0.876** (Fig. 11).

Al analizar los resultados obtenidos después de aplicar el criterio para reducción del sesgo en el disector de 170, se observa una mejora en la fecundidad promedio lo cual genera, que no se encuentren diferencias estadísticas significativas entre este método y el método de referencia **p-Valor = 0.345** (Fig. 12)., si bien con la aplicación de la metodología propuesta se observa que el sesgo presente en el disector 170 se redujo, sin embargo las estimaciones de fecundidad fueron inferiores al método de referencia, esto debido a la densidad de oocitos presentes en el ovario de *S.sagax* en relación con la profundidad del disector, es decir, al incrementar la profundidad del disector, por efecto de la densidad de oocitos en el ovario se eleva probabilidad de cortar oocitos diferentes que generen perfiles en las mismas coordenadas x, y en ambos planos de corte del disector.

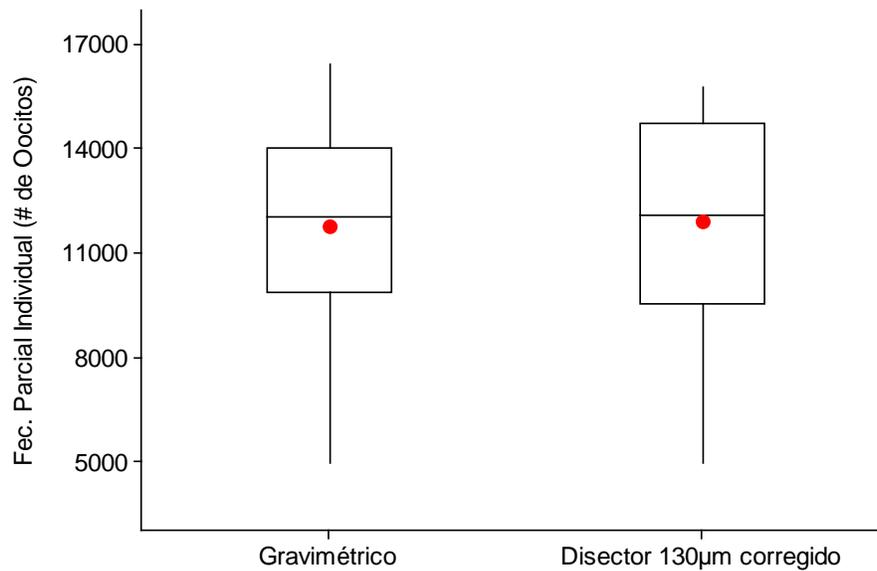


Figura 12.- Comparación de la estimación de fecundidad parcial individual de *S. sagax* obtenida con el Método Gravimétrico, vs El Disector 130µm corregido. $\alpha = 0.05$, $F = 0.02$, $p\text{-Valor} = 0.876$ y $gl = 53$

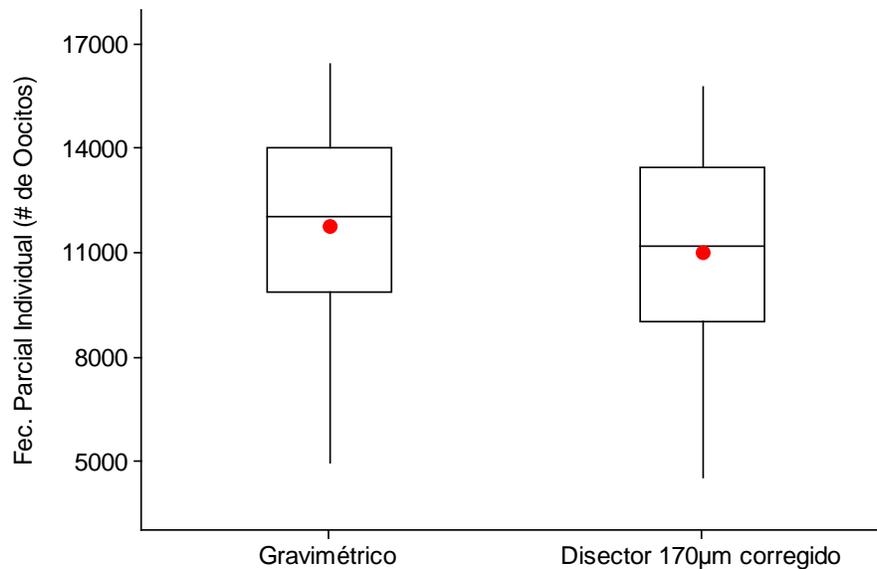


Figura 13.- Comparación de la estimación de fecundidad parcial individual de *S. sagax* obtenida con el Método Gravimétrico, vs. El Disector 170µm corregido. $\alpha = 0.05$, $F = 0.91$, $p\text{-Valor} = 0.345$ y $gl = 53$.

3.1.-Comparación de la estimación de la *Fpi*.

Una vez estimada la *Fpi* por los diferentes métodos se compararon los resultados de las estimaciones entre sí. Por medio del análisis de varianza, no se encontraron diferencias significativas entre las estimaciones, *p-Valor* = 0.051. Puesto que el valor de *p* es apenas significativo, por tanto, este resultado se tomó con precaución. El análisis pone en evidencia el efecto del sesgo presente en las estimaciones de fecundidad en los métodos estereológicos, método de Weibel y Gomez y el Disector físico, las cuales producen estimaciones más bajas que el método gravimétrico, utilizado como método de referencia (Fig. 13)

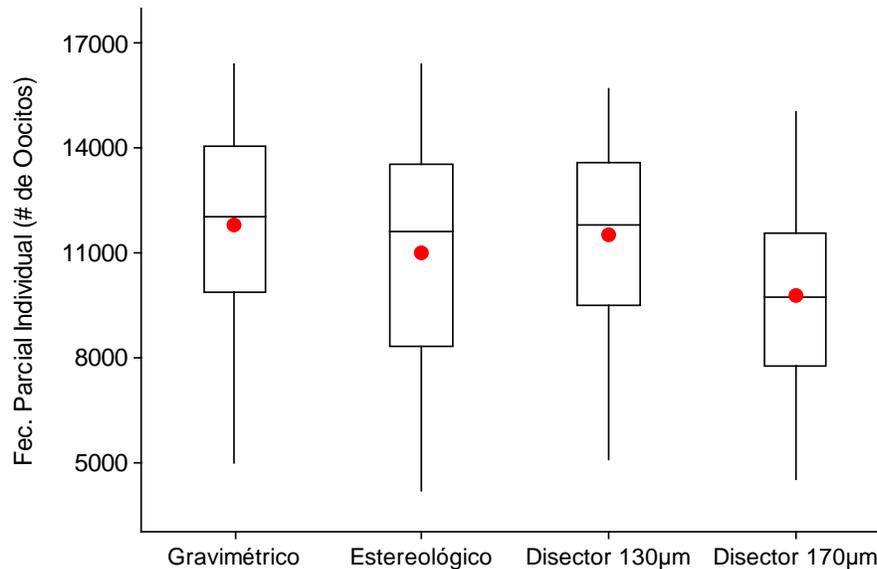


Figura 14.- Comparación de las estimaciones de fecundidad parcial individual de la sardina monterrey (*S. sagax*) por los tres métodos empleados en este trabajo. ($\alpha = 0.05$, $F = 2.68$, *p-Valor* = 0.051 y $gl = 107$).

Los resultados anteriores indican la existencia un sesgo en las estimaciones de fecundidad, en el caso del método de Weibel y Gomez, introducido por el encogimiento debido al proceso histológico. Y en el caso de los disectores de 130 y 170 µm, por la dificultad para establecer si dos perfiles de oocitos en los dos planos del disector corresponden a una sola partícula, o son dos distintas. Después de la corrección de estas estimaciones por las diferentes fuentes que introducen sesgo, se compararon los resultados mediante un ANOVA, y no se encontraron diferencias

estadísticas significativas entre las estimaciones, ***p-Valor = 0.682***. Si bien se observa una mejora en la estimación obtenida por el disector de 170 μ m, los resultados continúan con valores inferiores a los obtenidos por el método de Weibel y Gomez corregido por encogimiento y el disector de 130 μ m (Fig. 14).

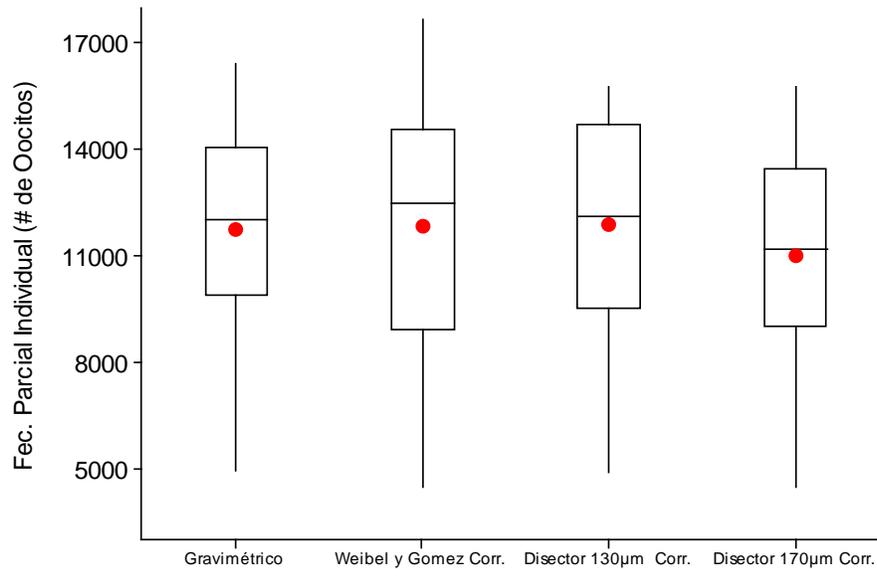


Figura 15.- Comparación de las estimaciones de fecundidad parcial individual de la sardina monterrey (*S. sagax*) por los tres métodos empleados en este trabajo, aplicando factores de corrección al método estereológico y los disectores de 130 y 170 μ m. $\alpha = 0.05$, $F = 0.50$, $p\text{-Valor} = 0.682$ y $gl = 107$.

Con la finalidad de analizar la precisión y reproducibilidad de los resultados obtenidos entre los diferentes métodos, se elaboraron curvas de calibración y se hicieron pruebas de comparación de pendientes para cada uno de las estimaciones, donde la referencia fue una pendiente de 45° ($\beta = 1$). El método gravimétrico se usó como referencia para todas las estimaciones de ***Fpi***.

La comparación la estimación de ***Fpi*** por el método de Weibel y Gomez con el método de referencia, gravimétrico, permitió observar que los valores de fecundidad se encontraban sesgados hacia la estimación por el método gravimétrico, así se obtenían valores de fecundidad más bajos con método de Weibel Y Gomez. En la comparación de pendientes se observó que no existían diferencias entre las pendientes $\beta = 1$ (Fig. 15 A). El sesgo observado en las estimaciones por el método

de Weibel y Gomez fue corregido por efecto del factor de encogimiento (7.57%); y en la comparación de pendientes no se identificaron diferencias $\beta = 1$, se observó una distribución homogénea de los valores de fecundidad con respecto de la línea de regresión, si bien en la comparación de ambas curvas no se observa una diferencia entre los valores R^2 , esta diferencia si es apreciable en el valor de la pendiente (Fig. 15B).

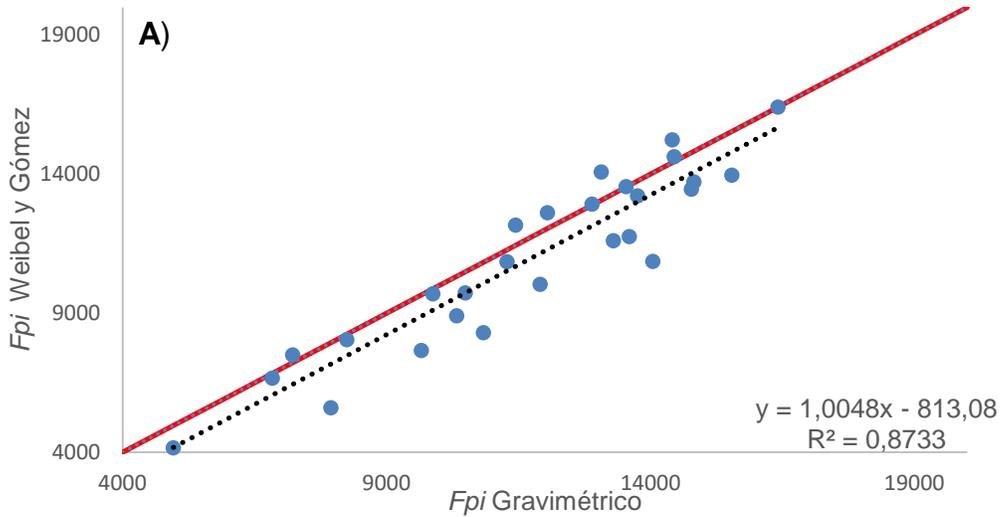


Figura 16A.- Curva de calibración Gravimétrico vs. estereológico de Weibel y Gomez en *S. sagax*. $T_{cal}= 0.06$ $T'_{cal}=2.06$ $\alpha=0.05$ $\beta =1$

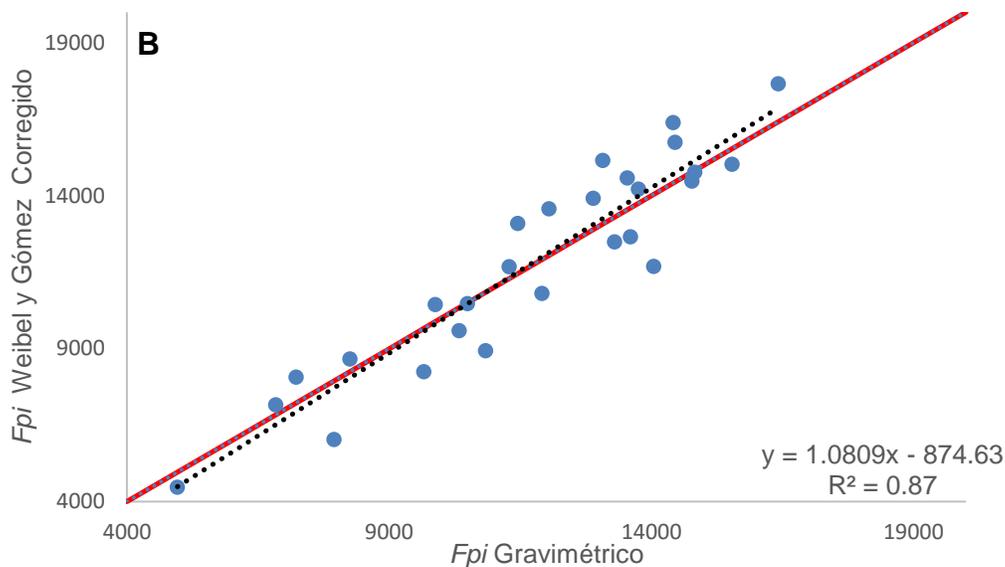


Figura 16B.- Curva de calibración entre el método Gravimétrico vs. estereológico de Weibel y Gomez Corregido en *S. sagax* $T_{cal}= 0.98$ $T'_{cal}=2.06$ $\alpha=0.05$ $\beta =1$

La comparación del método del disector con profundidad de 130 μm con el método de referencia, no tuvo diferencias significativas, se observó que los valores de fecundidad superiores a 9000 oocitos se encontraban sesgados hacia la estimación por el método gravimétrico, por esto se obtenían valores de fecundidad más altos con el método gravimétrico. Al comparar las pendientes se observó que no existían diferencias entre las pendientes $\beta = 1$, con una distribución homogénea de los valores de fecundidad con respecto de la pendiente igual a 1. (Fig. 16A).

El sesgo observado en las estimaciones por el método del disector de 130 μm fue corregido, y al compararse la pendiente obtenida contra una pendiente =1 no se identificaron diferencias $\beta = 1$, lo cual hace del método del disector de 130 μm un método preciso para la estimación de la **Fpi** en la sardina monterrey (Fig. 16B). Al comparar los resultados obtenidos por ambas curvas de calibración se observan diferencias en los valores de la ordenada al origen y en la pendiente, en el caso de esta última es igual a la unidad al momento de aplicar la corrección.

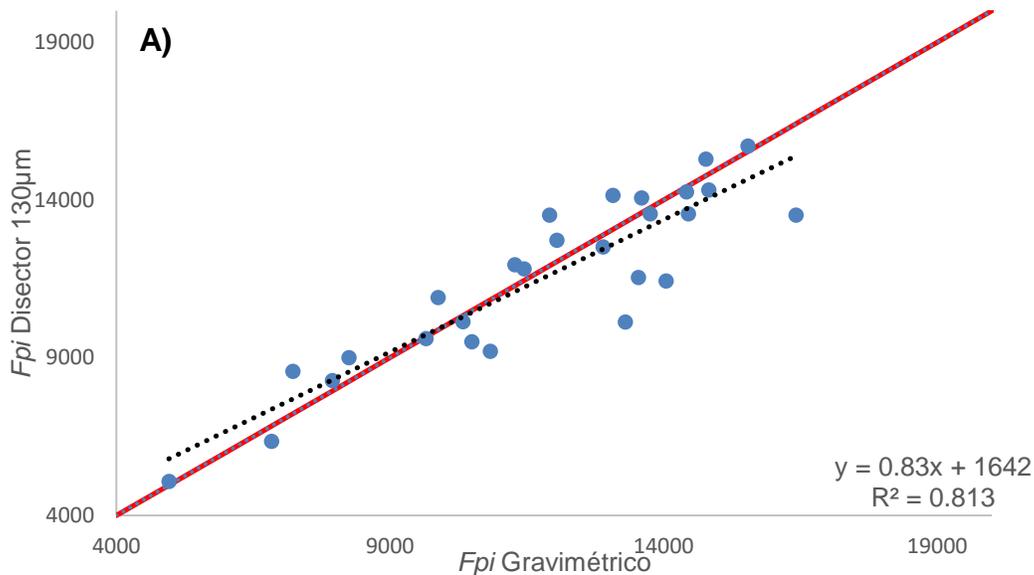


Figura 17A.- Curva de calibración Gravimétrico vs. Disector 130 μm en la sardina monterrey (*S. sagax*). $T_{cal}=2.01$ $T'_{cal}=2.06$ $\alpha=0.05$ $\beta = 1$

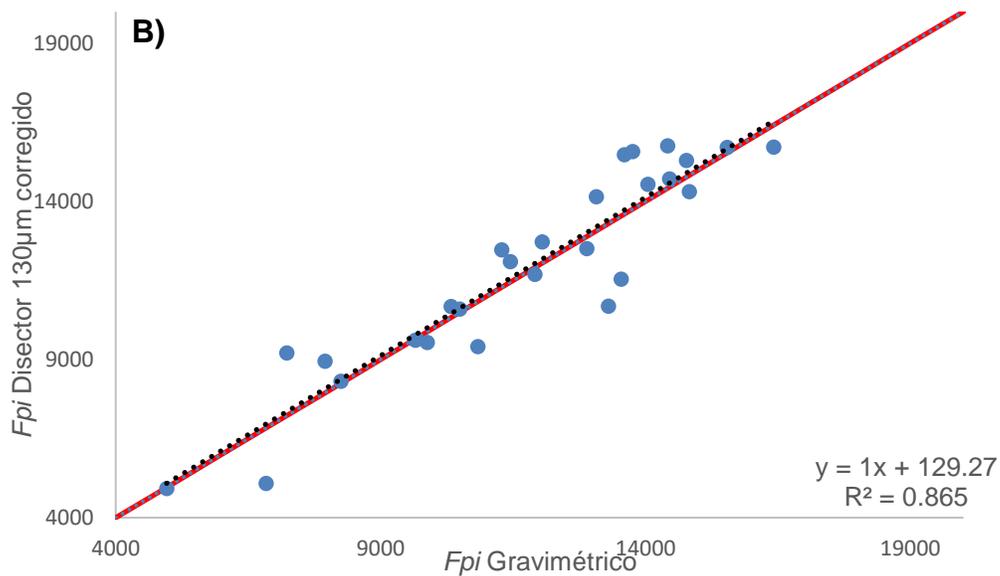


Figura 17B.- Curva de calibración Gravimétrico vs. Disector 130µm Corregido en la sardina monterrey (*S. sagax*). $T_{cal} = 0.0005$ $T'_{cal} = 2.06$ $\alpha = 0.05$ $\beta = 1$.

Las estimaciones de fecundidad por el método del Disector Físico con profundidad de 170 µm, fue significativamente diferente ***p-Valor = 0.008*** de las obtenidas por el método de referencia. Se observó que los valores de fecundidad se encontraban sesgados hacia la estimación por el método gravimétrico, entonces, se obtenían valores de fecundidad más altos con el método gravimétrico. Al comparar las pendientes se observó que existían diferencias entre las pendientes **$\beta \neq 1$** , debido al sesgo presente en las estimaciones por la dificultad que representa definir, si dos perfiles de una partícula que coinciden en los dos planos del disector, corresponden a una sola partícula o son dos independientes (Fig.17 A). Una vez corregida esta estimación utilizándose el criterio propuesto para disminuir el sesgo, se observa una mejor estimación de fecundidad, si bien estas últimas fueron inferiores al método de referencia, no se encontraron diferencias estadísticas significativas ni en el análisis de varianza ***p-Valor = 0.345***; ni en la comparación de pendientes **$\beta = 1$** (Fig.17 B), lo cual lo indica que es un método adecuado para la estimación de la fecundidad parcial individual en la sardina monterrey.

Al compararse los parámetros de las regresiones se observa una mejora en los tres casos (pendiente, ordenada al origen y R2.) al momento de corregir la fecundidad en el método del disector de 170 μm , por la dispersión de los valores alrededor de la línea de pendiente =1 se puede observar la existencia de una reducción del sesgo, manteniéndose una imprecisión importante en la estimación.

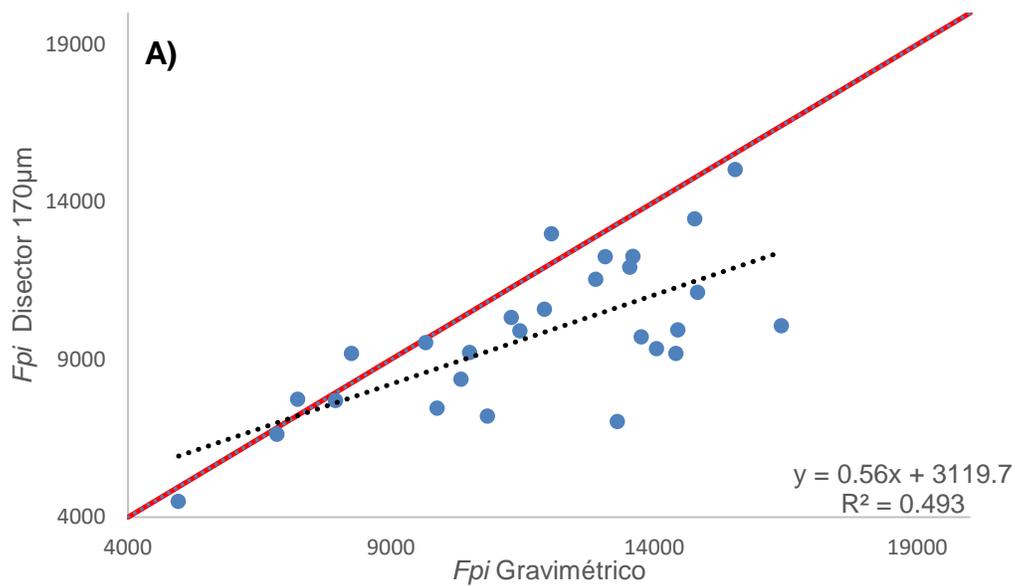


Figura 18A.- Curva de calibración método Gravimétrico vs Disector 170 μm en la sardina monterrey (*S. sagax*). $T_{cal}= 3.77$ $T'_{cal}=2.06$ $\alpha=0.05$ $\beta \neq 1$

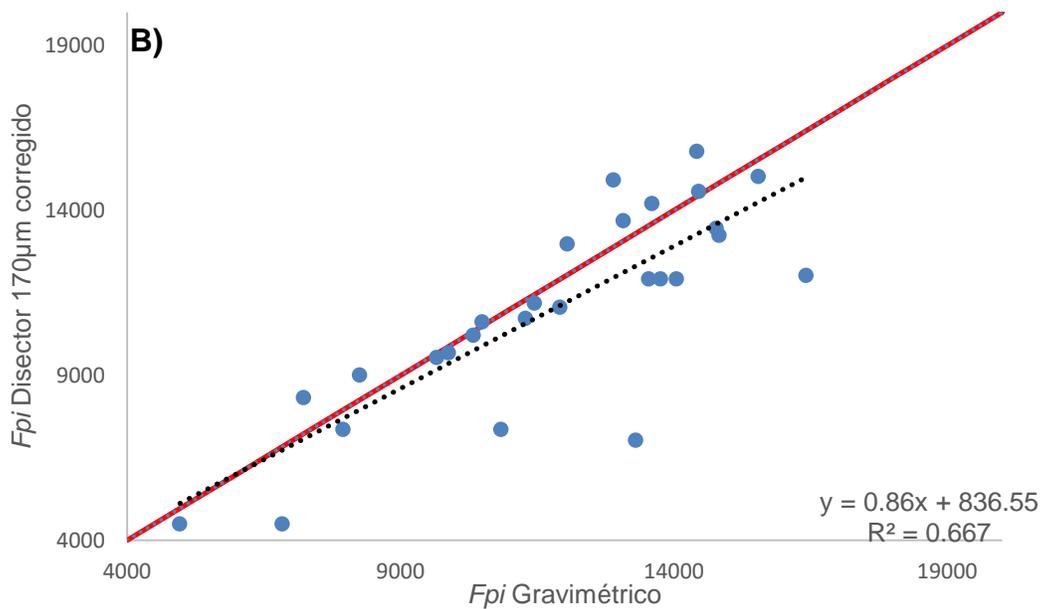


Figura 18B.- Curva de calibración método Gravimétrico vs. Disector 170 μ m Corregido en la sardina monterrey (*S. sagax*). $T_{cal}= 1.12$ $T'_{cal}=2.06$ $\alpha=0.05$ $\beta =1$

Se hizo un análisis comparativo de las ventajas y desventajas de cada método utilizado en el presente trabajo (Tabla VII). Se presenta a manera de semáforo donde los atributos marcados en verde representan las mejores características, en tanto que, los marcados en amarillo son las características intermedias y en rojo las menos recomendables o pésimas. Con este análisis de ventajas se seleccionó el método de Weibel y Gomez para la estimación de los índices de atresia, Fpi y \widehat{Fpl} .

Tabla VII.- Ventajas y desventajas de los métodos analizados, en verde se presentan las mejores características, en amarillos las intermedias y en roja las malas

Característica	Gravimétrico asistido por procesamiento digital	Método Weibel Y Gomez	Disector
La discriminación de los oocitos.	Diámetro	Características histológica	
Permiten medir e incluir la atresia en las determinaciones de fecundidad.			
Esfuerzo del procesamiento de muestras.			
Costos de almacenaje de muestras.			
Costo en horas persona ⁻¹ contajes de oocitos.			
Eliminación de riesgo en la seguridad del trabajo y contaminación ambiental por el uso de reactivos peligrosos.			
Estimaciones de parámetros reproductivos de temporadas pasadas a partir de colecciones histológicas.			

4.-Estimacion de los índices de atresia.

4.1.-La prevalencia de atresia

Durante la temporada reproductiva de *S. sagax* en el 2007 el seguimiento mensual de la prevalencia de atresia α en oocitos en estadio de madurez avanzada; mostró una tendencia a incrementarse conforme transcurre la temporada de puesta, y se obtuvieron las menores frecuencias al iniciarse del máximo de puesta y las máximas hacia el final de esta. Al comparar la frecuencia de hembras activas con la prevalencia de atresia, se observó que durante los meses de enero-marzo ambos índices muestran una tendencia a incrementar. Durante la parte final del pico (marzo y abril) se observa una tendencia inversa entre la frecuencia de hembras activas, y la prevalencia de atresia este cambio en las tendencias sugiere el final del máximo de puesta (Fig. 19).

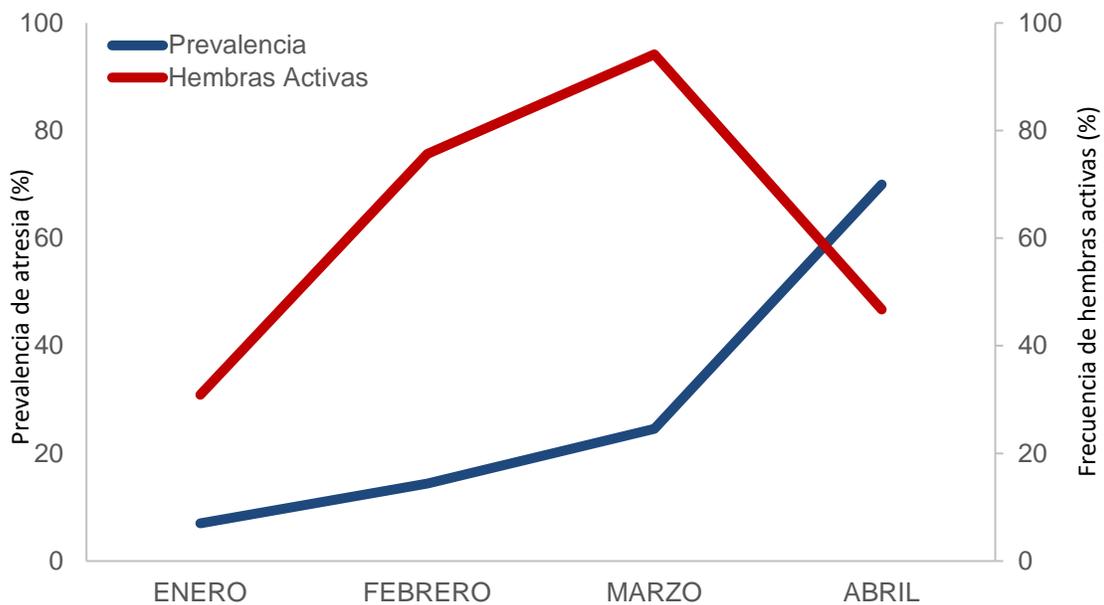


Figura 19.- Prevalencia de atresia α observada durante la temporada de puesta de *S. sagax*.

4.2.- La intensidad relativa individual de atresia α .

El seguimiento de la intensidad individual de atresia durante la temporada de pesca 2007, mostró una tendencia a incrementar en el transcurso de la temporada de puesta, misma tendencia que se observó en la frecuencia de hembras activas. Debido al mal estado del material fijado como de los cortes histológicos presentes en la colección, no fue posible estimar la intensidad individual durante el mes de abril, sin embargo, debido a la relación observada entre la atresia y el final del proceso reproductivo, habría de esperarse un incremento de la intensidad individual de atresia (Fig.20).

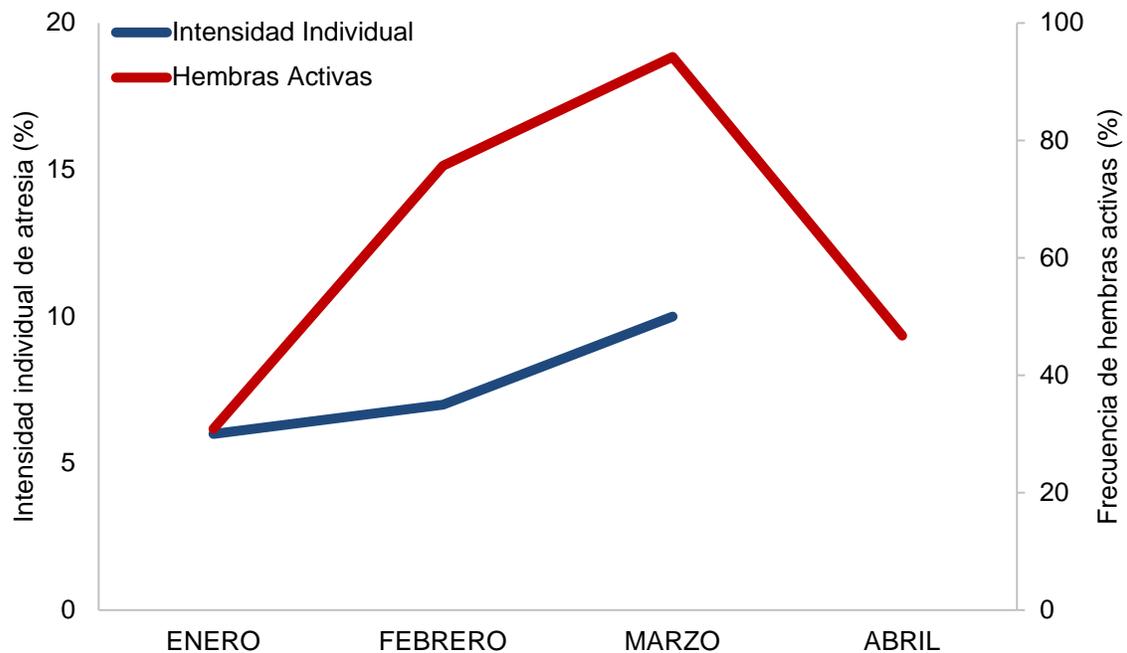


Figura 20.- Intensidad relativa de atresia α observada durante la temporada de puesta de *S. sagax*.

4.3.-La intensidad relativa poblacional de atresia α

El seguimiento de la intensidad relativa de atresia a nivel poblacional registró el mismo patrón que la intensidad de atresia, ambas presentaron los valores bajos durante enero, periodo con una baja frecuencia de hembras activas. Para los meses subsiguientes (Febrero y Marzo) se registró un aumento en este índice el cual estuvo influenciado por el aumento de la prevalencia de atresia α en la población, se presentó este mismo patrón, atribuido tanto al mal estado del material tanto fijado como a los cortes histológicos no fue posible estimar las intensidades individual y poblacional de atresia durante el mes de abril. Además, debido a la relación de la intensidad de atresia poblacional con la prevalencia de atresia, es de esperarse que la intensidad relativa poblacional, fuera superior durante abril y por tanto, presentase una tendencia inversa con la frecuencia de hembras activas, sería la evidencia del final del pico reproductivo de *S.sagax* (Fig. 21).

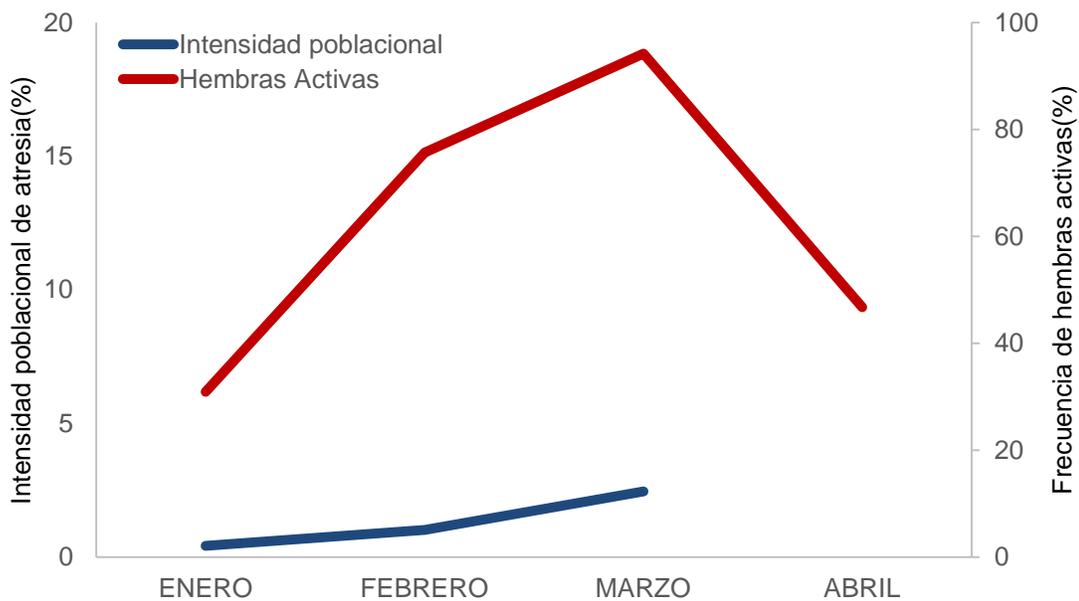


Figura 21.-Atresia poblacional observada durante la temporada reproductiva de *S. sagax*.

5.- Estimación de la fecundidad parcial individual real (\widehat{Fpi})

5.1.- Comparación estadística de los resultados de la estimación de la Fpi y \widehat{Fpi} .

Para estimar la Fpi evaluando el efecto de la atresia, Se utilizaron los mismos organismos que se empleados en la estimación de los índices de atresia, dado que estos comparten las características necesarias para la estimación tanto de los índices de atresia como para la estimación de la fecundidad.

Posteriormente a la selección de los organismos para estimar la fecundidad, se hizo la estimación de la Fpi y la \widehat{Fpi} , el valor estimado de Fpi para la temporada de reproducción 2007 en Ensenada B.C en $\bar{X} = 12281$, $\sigma^2 = 3048$ oocitos y la \widehat{Fpi} promedio fue de $\bar{X} = 11164$, $\sigma^2 = 3041$ oocitos. Los resultados de Fpi y \widehat{Fpi} fueron comparados mediante un análisis de varianza con el objetivo de evaluar si la reducción del número de oocitos producida por el proceso de atresia es significativa, se observó que el proceso de atresia tuvo un efecto significativo sobre la estimación de fecundidad, la reducción fue de un 9.1% **p-Valor = 0.023**; Figura 22.

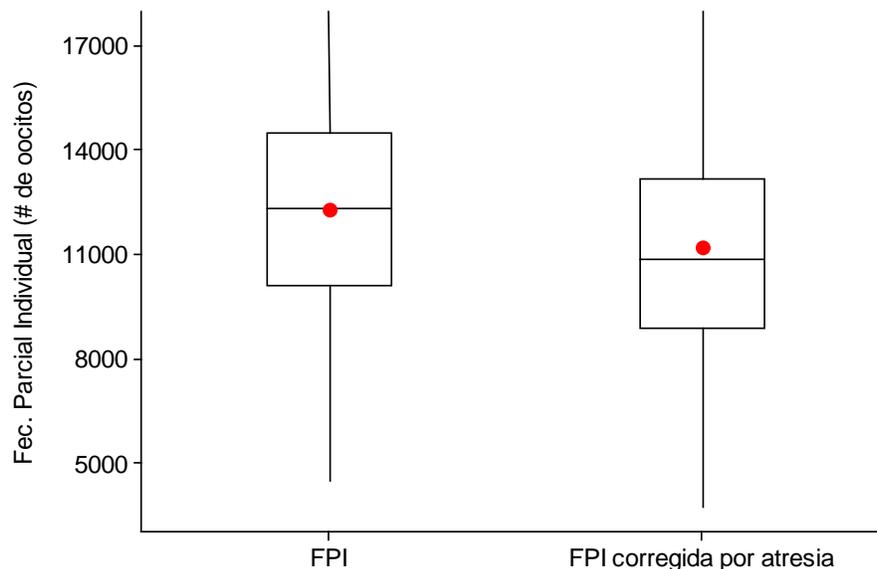


Figura 22.-Comparación entre la fecundidad parcial individual (Fpi) y la fecundidad parcial individual real (\widehat{Fpi}). f -Valor =5.25 p -Valor = 0.023 $DF = 155$ $\alpha = 0.05$

Al observarse diferencias significativas en la estimación de la **Fpi** y la $\widehat{Fpl.}$, se hizo un análisis de varianza por mes (Tabla VIII), se encontró que, en el mes de enero el proceso de atresia no tuvo efectos significativos sobre la fecundidad (**p-Valor = 0.59**). Esto puede relacionarse con la baja intensidad de atresia poblacional (0.42%) observada en enero. Durante el mes de febrero la reducción en la producción de oocitos fue mayor comparada con lo encontrado en enero; esta reducción no tuvo un efecto significativo en la reducción de la **Fpi** (**p- Valor = 0.19**), y es un reflejo claro del aumento registrado en la intensidad relativa de atresia poblacional, de 0.4% en el mes de enero a un 1% en el mes de febrero.

Con respecto al mes de marzo, la reducción de la **Fpi** por efecto de la atresia fue mayor comparado con los dos meses anteriores, lo cual se puede relacionar con el incremento de la intensidad relativa de atresia poblacional observado durante este mes. El análisis estadístico se obtuvo que la reducción en la fecundidad por atresia no fue significativa, ($\alpha= 0.05$) (**p-Valor 0.06**) ver Fig. 23.

Tabla VIII.- Resultados de las estimaciones de fecundidad parcial individual y fecundidad parcial individual real, por mes obtenidas por el método estereológico de Weibel y Gomez.

<i>Mes</i>		<i>Fecundidad Parcial Individual</i>	<i>Fecundidad Parcial Individual real</i>	<i>Anova</i>
Enero	Promedio	10458	9656	<i>f-Valor</i> =0.30
	Desviación Estándar	3414	3101	<i>p-Valor</i> =0.59 <i>DF</i> =19
	n	10	10	α = 0.05
Febrero	Promedio	12188	11150	<i>f-Valor</i> =1.71
	Desviación Estándar	3247	2772	<i>p-Valor</i> =0.19 <i>DF</i> =57
	n	29	29	α = 0.05
Marzo	Promedio	12817	11561	<i>f-Valor</i> =3.59
	Desviación estándar	2668	3168	<i>p-Valor</i> =0.06 <i>DF</i> =77
	n	39	39	α = 0.05

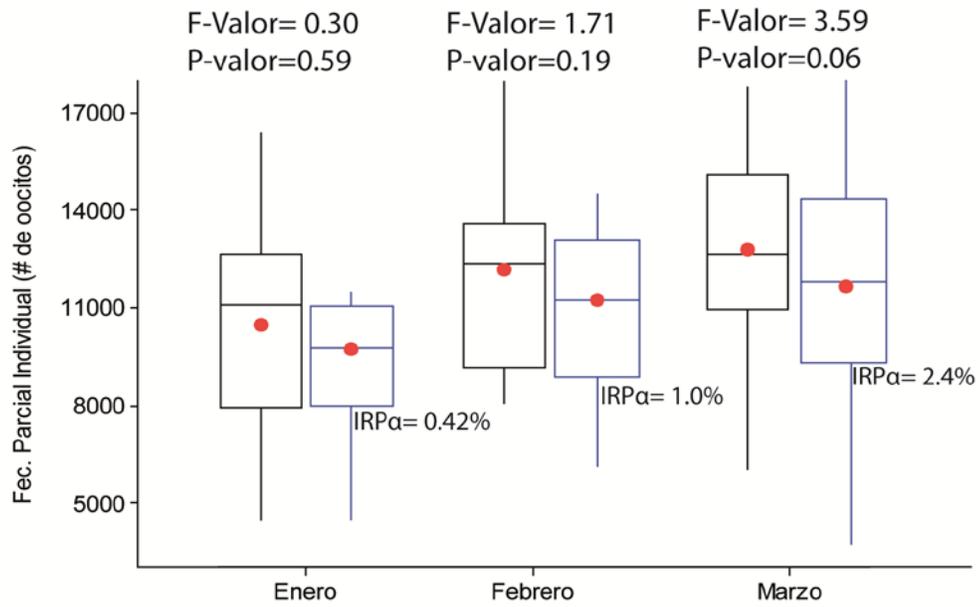


Figura 23.- Comparación entre la fecundidad parcial individual (Fpi) en negro y la fecundidad parcial individual real por meses(azul), en relación con el índice de intensidad relativa poblacional de atresia α .

Discusión.

La gestión de los recursos pesqueros se basa en la relación stock-reclutamiento y en los supuestos de Beverton & Holt (1957), estos establecen: 1) existe un número promedio de gametos producidos por unidad de biomasa, y 2) todos los huevos producidos tienen la misma oportunidad de supervivencia. Durante los últimos años el hecho de que la biomasa desovante produce progenie con tasas de supervivencia independientes de las características parentales de la población desovante ha sido ampliamente cuestionada (Saborido-Rey *et al.* 2003; Marshall *et al.* 2003; Lambert, 2008).

En esta discusión Gundersen *et al.* (2000) resaltan la gran importancia de las estimaciones de la fecundidad y su variación para el manejo de las pesquerías, debido al vínculo entre el stock reproductivo y el reclutamiento subsecuente.

Dentro de este debate el tema de la atresia como mecanismo de control de la fecundidad se encuentra en medio de una discusión sobre los mecanismos que controlan el reclutamiento (Chambers & Trippel 1997) y (Marshall *et al.* 2003). Dónde el problema básico es la relación entre la magnitud y la dinámica del stock de oocitos producidos en la temporada de puesta y su relación con el reclutamiento. En este sentido Armstrong & Witthames (2012) señalan la importancia de recabar información del ciclo reproductivo en series de tiempo, a fin de establecer la influencia de la talla, la condición de los peces y el control de la atresia en la producción de oocitos. El problema fundamental para obtener los datos necesarios para construir las series de tiempo propuestas, consiste en aplicar técnicas cuantitativas para estimar la tasa de producción de oocitos y el efecto de la atresia. Dadas las dimensiones microscópicas en que se lleva a cabo este proceso, necesariamente se observa sólo en el análisis histológico. En este sentido Weibel *et al.* (1966) discuten sobre los métodos estereológicos:

“Los métodos estereológicos proporcionan los medios eficientes para producir datos cuantitativos sobre la estructura interna de órganos, tejidos y células”.

Estos métodos son ampliamente utilizados en el área médica, por ejemplo, en Neurociencias y Patología (Gundersen *et al.*, 1988a), (Mayhew, 1991), (Mandarim-de-Lacerda, 2003), (Santamaría-Solis *et al.*, 2013).

von Bartheld (2002) plantea una diferenciación entre los métodos estereológicos, por un lado se tienen los métodos “2D” basados en perfiles; para su aplicación se requiere que el investigador asuma algunos parámetros de las estructuras a contabilizar, los parámetros son: la forma, el tamaño y la distribución de las partículas. Por otro lado, se encuentran los métodos “3D” en los cuales estos parámetros son estimados directamente.

En una revisión de los métodos estereológicos “2D” y “3D” von Bartheld (*Op. Cit.*) establece que antes de decidir que método es el más adecuado, es necesario calibrarlos y validarlos con un método de referencia. En el caso que analiza, se trata de aplicaciones en ciencias médicas, recomienda una reconstrucción tridimensional de la estructura con cortes seriados de toda la estructura analizada.

El análisis de los métodos concluye que ninguno de los ellos es perfecto, incluso los métodos “3D”, que erróneamente se les asigna el calificativo de “insesgado”, en este sentido hace incapie de la importancia de encontrar y minimizar las fuentes de sesgo presentes en las estimaciones.

En el caso del presente trabajo se aplicaron ambos tipos de métodos. En el caso del método 2D se utilizó el método de Weibel y Gomez, sin embargo en el presente trabajo. No se asumieron los parámetros anteriormente descritos, se sustituyeron por parámetros previamente estimados. En el caso de la distribución de oocitos Torres-Villegas (1986) menciona que la distribución de los oocitos en la gónada de *S.sagax* es homogénea en la gónada. Con respecto a la forma de los oocitos se utilizó un valor para el parámetro β (factor de forma), igual factor de forma para la esfera, puesto que, al observar los oocitos al estereomicroscopio presenta forma esférica. Con respecto al tamaño de los oocitos, este fue estimado mediante el coeficiente de talla de los oocitos K .

El método "3D" utilizado en el presente trabajo fue el Disector Físico con dos profundidades, debido a que Sterio (1984) menciona que la profundidad a utilizar en la aplicación debe ser inferior al tamaño de las partículas a contabilizar y Gundersen *et al.*(1988) mencionan que la distancia entre los cortes que definen el disector debe fijarse entre un 1/3 a 1/4 la altura de las partículas a contar, un criterio a utilizarse para asignar la profundidad es la densidad de partículas, cuando la densidad sea alta se deberá utilizar una menor distancia entre los planos del disector. En el presente trabajo al aplicarse disectores a dos profundidades evaluó el efecto que tiene la profundidad en las estimaciones en relación con la densidad de oocitos, que en el caso de la sardina es alta. En presente estudio se utilizó como método de validación y calibración el método gravimétrico, los resultados no evidenciaron diferencias estadísticamente significativas. Lo anterior abre la posibilidad de hacer estimaciones cuantitativas del número de oocitos contenidos en la gónada de *S. sagax* a partir de cortes histológicos, con la aplicación de método del Disector Físico.

Una de las primeras fuentes de sesgo en las estimaciones con métodos estereométricos es el encogimiento de los tejidos como resultado del proceso histológico (von Bartheld, 2002; Pertusa Grau, 2003). En general esta característica del material histológico se ha documentado ampliamente. La primera y más significativa fuente de encogimiento sucede durante la fijación (Klibansky & Juanes 2007). Seguido por el proceso de deshidratación e inclusión en parafina o medios de inclusión similares como el Paraplast o Paraplast Plus, así como por el efecto de arrastre causado por la acción de la cuchilla al obtener los cortes al micrótopo (Weibel, 1979). Mandarim-de-Lacerda *et al.* (1985) estudiando embriones humanos y Mandarim-de-Lacerda & Penteado (1988) con biopsias del atrio-ventricular del corazón del mono *Macaca fascicularis*, estiman el encogimiento del material por el proceso histológico en 25% y como resultado el efecto de arrastre del 10% en relación al material en fresco. En estos cálculos incluyen el encogimiento por la fijación del material. El factor de encogimiento estimado fue menor a los reportado en trabajos anteriores, se debe a que no se incluyó el efecto de la fijación y el encogimiento se estimó únicamente en el diámetro de los oocitos en madurez final, utilizados para la estimación de la fecundidad parcial. El encogimiento de los oocitos

se relaciona directamente con la composición y estructura de los tejidos en las muestras y de los compuestos químicos incluidos en el material, de tal manera que el encogimiento estimado en los oocitos se limita básicamente a la cantidad de agua contenida en los oocitos de este estadio. Lo anterior es una diferencia sustancial con oocitos en etapas tempranas de la vitelogénesis. Es importante tener en cuenta el encogimiento en las estimaciones estereológicas debido a que, tanto en métodos “2D” o “3D”, se obtiene una densidad de partículas por volumen lo que se extrapola al volumen total de los ovarios. Entonces las estimaciones por estereometría se hacen en las preparaciones histológicas, las cuales contienen todos los artefactos de técnica como encogimiento y arrastre, los cuales hay que extrapolarse al volumen de los ovarios. En estas condiciones se deben considerar todos estos parámetros que son las más aparentes fuentes de sesgo en las estimaciones estereológicas finales.

von Bartheld (2002), señala que otra fuente que introduce sesgo en las estimaciones estereométricas es, la ausencia de aleatoriedad en el muestreo en el sentido más amplio; es decir, desde la toma de las muestras en el campo, hasta el conteo de las partículas en los cortes histológicos.

En el caso de la sardina monterrey la aleatoriedad de los distintos muestreos implicados en las estimaciones de fecundidad parcial y atresia, pudiese perderse por el comportamiento de las hembras en desove, en estado de hidratación, las cuales se agrupan para la puesta. Esta segregación fue documentada por Hunter y Golberg 1980; Hunter *et al.*, 1985; Stratoudakis *et al.*, 2006. Sin embargo, este sesgo no se encuentra en las muestras utilizadas en este trabajo, debido a algunas consideraciones metodológicas previas a la toma de la muestra, por ejemplo, evitar la toma de muestras de lances consecutivos con menos de una hora de diferencia, evitar la toma de muestras de lances consecutivos cuya distancia sea inferior a 4 millas náuticas (Torres-Villegas *et al.*, 2006). En cuanto a la selección de los individuos utilizados para las estimaciones se conservó la aleatoriedad, mediante la selección de hembras por números aleatorios, la cual da la misma probabilidad formar parte de la muestra a cada hembra. Este mismo criterio fue utilizado para la

selección de los cuadrantes a utilizar durante las estimaciones de fecundidad y atresia.

La comparación de los resultados presentados en las estimaciones de fecundidad parcial con el Disector Físico en dos profundidades evidencian un sesgo por el efecto de la densidad de los oocitos, los cuales se encuentran en folículos que están en contacto directo unos con otros en una estructura muy compacta; el efecto es más evidente en el disector de mayor profundidad. De tal forma que cuando un oocito es cortado por el primer plano de disector o corte de referencia, cercano a los polos del oocito esférico, es probable que exista una célula contigua, que al momento de hacer el segundo corte del disector o corte de búsqueda, se obtenga un perfil en la misma posición del perfil en el primer plano. Esto hace difícil definir si el perfil en cada plano de corte corresponde a una sola partícula o a dos partículas diferentes, Gundersen *et al.* (1988) mencionan que:

"Con el fin de identificar y distinguir las diferentes partículas correctamente, se debe evitar utilizar secciones con un grosor superior a 1/4 -1/3 de la altura de las partículas, lo cual en la práctica es la restricción más importante. Si las partículas están distribuidas en densidad baja se pueden usar secciones ligeramente más gruesas, mientras que para partículas densamente empaquetadas puede ser necesario usar secciones muy delgadas."

Efectivamente, los datos obtenidos con los disectores de dos profundidades indican un compromiso entre la profundidad del disector, la densidad de los oocitos en el ovario. Otros autores han descrito este hecho y dejan el poder de definición en manos de la experiencia del microscopista (Pertusa Graw 2003). Las estimaciones mejoran al usar la corrección geométrica propuesta en este trabajo, lo que permite parametrizar esta fuente de sesgo, este medio puede ser insuficiente para los datos del disector más profundo. Por lo que se sugiere, previo al uso del disector físico se prueben distintas profundidades para alcanzar el óptimo, y las pruebas sean validadas e intercalibradas con un método de referencia tal como lo describe von Bartheld (2002).

Además del compromiso entre la densidad de las partículas y la profundidad del disector como fuente de sesgo hay otro parámetro que debe considerarse y es la alineación entre los perfiles de los dos cortes que definen al disector. Esta operación es una de las tareas que requiere de mayor tiempo en el proceso para las estimaciones estereológicas (von Bartheld (2002)). Este tema no fue evidente en el disector corto, dado que la proximidad de los perfiles hace más probable que las partículas o tejidos utilizadas como puntos de referencia permanezcan entre el plano de referencia y el plano búsqueda del disector. Caso contrario en lo ocurrido el disector largo donde la probabilidad de que esto ocurra disminuye. Una posible forma de reducir el sesgo persistente en el disector de mayor profundidad, es el incluir puntos de referencia en las inclusiones, lo cuales permitirían alinear los cortes para compararse entre el planos superior e inferior del Disector Físico. von Bartheld (*Op.Cit*) menciona que una aliniación deficiente entre los planos de corte que conforman el disector sería una causante de sesgo.

Si bien la comparación de los tres métodos estereológicos para estimar la fecundidad con respecto al método usado como referencia, no pone en evidencia diferencias significativas, en tanto, las regresiones de las calibraciones con los datos corregidos son significativas. Son evidentes las mejoras en las estimaciones obtenidas con los métodos de Weibel y Gomez "2D" y Disector Físico de $1/4$ "3D" corregidos por las fuentes de sesgo. Lo cual abre la posibilidad de estimar la **Fpi** en la sardina aplicándose cualquiera de estas dos metodologías con resultados comparables en magnitud y precisión. Lo anterior es consistente con una de las recomendaciones hechas por von Bartheld (2002) quien menciona:

"Es posible utilizar ambos tipos de métodos en beneficio de nuestros estudios con prudencia y sentido común, reduciendo en lo posible la introducción de sesgos. Aplicar calibraciones en caso de que se requieran números absolutos o la existencia de una remota posibilidad de que las conclusiones de nuestros estudios sean alteradas por sesgos."

La ausencia de diferencias estadísticas entre los métodos, obliga a hacer un análisis de las ventajas y desventajas de los métodos. von Bartheld (*Op. Cit.*) a través de un

análisis sobre los métodos “3D” y “2D” para estimar la densidad de partículas, menciona “El conteo “3D” es algo más lento, además requiere de tediosas alineaciones y conteos de dos secciones”, además la reducción del sesgo depende de “la cantidad de esfuerzo que el investigador está dispuesto a invertir”. En contraparte menciona que los métodos “2D” “proporcionan estimaciones no sesgadas si se cuenta con indicadores de las fuentes de sesgo involucradas”.

Otro análisis de ventajas y desventajas sobre los métodos para estimar la densidad de partículas, en este caso con aplicaciones directas para la estimación de la fecundidad en peces, es la realizada por Murua *et al.* (2003) y Saborido- Rey (2008), ellos comparan tanto métodos gravimétricos-volumétricos y métodos estereométricos 3D y 2D, su análisis es consistente con lo encontrado en nuestro trabajo. La ventaja más relevante es la presentada por los métodos estereológicos, la posibilidad de estimar fecundidad y la atresia, debido a que la determinación se basa en las características histológicas de los oocitos y no en el diámetro como los métodos gravimétricos-volumétricos.

Otra ventaja de gran importancia encontrada en el presente trabajo es la reducción en el número de horas y personas utilizadas en el conteo de oocitos, lo cual concuerda con lo descrito por Murua *et al.* (2003) y Saborido- Rey (2008) ésta reducción es más importante en los métodos 2D. La misma ventaja es descrita por von Bartheld (2002) quien menciona que los métodos “2D” con respecto a los métodos “3D”, como el disector físico, son más eficientes en cuanto al tiempo utilizado para la estimación de la densidad de partículas y por eso son preferidos por los investigadores.

Los resultados obtenidos con las calibraciones y el análisis de las ventajas de los métodos en este trabajo, abren la posibilidad de hacer estimaciones de la **Fpi**, índices de atresia, etc. en la sardina monterrey, a partir de colecciones histológicas existentes. Pudiendo así satisfacer la necesidad de contar con información biológica-reproductiva en series de tiempo lo suficientemente grandes (Torres-Villegas 1986, Torres-Villegas 2007 Armstrong & Witthames 2012) que permitan comprender de mejor manera las variaciones de las tasas reproductivas y de la producción de oocitos.

Una consecuencia importante de no encontrar diferencias estadísticas significativas entre los métodos analizados, es la posibilidad de utilizar el método del Disector Físico como un método de referencia, permitiría validar y calibrar las estimaciones obtenidas por el método de Weibel y Gomez, y aprovechar sus ventajas metodológicas, lo cual trae consigo una serie de posibles aplicaciones. Una de las más importantes es la posibilidad de hacer estimaciones de parámetros reproductivos como la fecundidad y atresia, a nivel poblacional, derivado de la reducción en costos que implica analizar un gran número de muestras.

Por otro lado, abre la posibilidad de hacer un seguimiento de forma rápida y precisa del efecto de la atresia en el reclutamiento de oocitos de un estadio de madurez a otro, lo cual debe integrarse a lo largo de la temporada con observaciones repetidas durante el periodo de puesta. Lo anterior es relevante para las estimaciones del potencial reproductivo en especies con “fecundidad indeterminada” como la sardina monterrey.

Como ya se mencionó, la evaluación del potencial reproductivo de las poblaciones de peces requiere una comprensión de las características reproductivas específicas de las poblaciones. Dentro de estas características se incluyen la de madurez, la fecundidad potencial y real, entre otros. Lambert *et al.*, (2003) plantean que:

“La variación de estas características puede generar cambios importantes en el potencial reproductivo de las poblaciones con implicaciones en el reclutamiento, sin embargo, a pesar de la importancia que estos parámetros tienen sobre el potencial reproductivo de una población, este no se mide ni se usa de forma rutinaria en las evaluaciones de las poblaciones”.

Lo anterior deriva de la falta de información con la frecuencia y precisión apropiada, lo cual es un reflejo del esfuerzo y tiempo necesario para obtener las muestras para este tipo de evaluaciones. Además de la dificultad y el tiempo dedicado para obtener estos parámetros de forma precisa; en esto último, las técnicas estereológicas evaluadas en el presente trabajo representan un avance significativo esto visto desde dos puntos de vista: 1) La reducción en el número de horas persona, el cual es inferior a los métodos convencionales y 2) la precisión la cual está dada por la

posibilidad de hacer las estimaciones en base a las características histológicas de los oocitos y no por diámetro como lo hacen las técnicas convencionales.

Witthames *et al.* (2009) mencionan la importancia de obtener estimaciones de la fecundidad y lo expresa en la siguiente expresión:

“La fecundidad de la población (producción total de huevos) tiene dos aplicaciones importantes en el manejo de los recursos pesqueros; 1) la aplicación de la fecundidad para estimar la biomasa de la población reproductora y 2) y quizás la más importante sea entender la relación entre la biomasa de la población reproductora y el reclutamiento”.

En este sentido Lambert *et al.* (2003); Lowerre-Barbieri (2009); Carmo do Silva *et al.* (2016) señalan que el conocimiento de la fecundidad es indispensable para calcular el potencial reproductivo de una población, y mejorar nuestra capacidad de estimar el reclutamiento y la productividad de la población. Con base en estas consideraciones, si el objetivo es estimar la fecundidad como un parámetro para satisfacer la estimación de biomasa desovante por el método de producción diaria de huevos, se puede recomendar el uso de cualquiera de los métodos analizados en el presente trabajo, la selección del método dependerá de las condiciones tecnológicas y de trabajo con las que se cuente. Por otro lado, si el objetivo es generar estimaciones de los parámetros reproductivos con miras a entender la relación entre potencial reproductivo y el reclutamiento subsecuente, la única vía para abordarlo es la aplicación de las técnicas que involucren el análisis histológico para la discriminación de los oocitos a utilizar en las determinaciones de fecundidad real, definida por Lambert *et al.* (2003) como: *“El número oocitos producidos”* es decir la fecundidad potencial menos la reabsorción por atresia.

Se sabe que las características reproductivas como la fecundidad y la maduración varían entre las especies, las poblaciones, las zonas geográficas y los años, y que están influenciadas por factores genéticos y ambientales. Numerosos factores biológicos y ambientales influyen directa o indirectamente en la maduración y la fecundidad; estas relaciones hasta la actualidad no son bien entendidas (Lambert *et al.*, 2003). Se requiere desarrollar métodos alternativos para medir las relaciones

entre los parámetros reproductivos y el ambiente, más allá de medir la relación directa y lineal entre un parámetro ambiental y un parámetro reproductivo

En la búsqueda de estos métodos alternativos que ayuden a entender las relaciones entre el ambiente y los parámetros reproductivos, y por ende, ayuden a mejorar las predicciones sobre el estado de las poblaciones y ayudar a explicar tendencias históricas en el tamaño de las poblaciones, se ha empezado discutir el tema de la atresia como mecanismo de control de la fecundidad, (Chambers & Trippel, 1997 y Marshall *et al.*, 2003). En esta discusión Gundersen *et al.* (2000) resaltan la gran importancia, para el manejo de las pesquerías, de tener estimaciones de la fecundidad y su variación, puesto que es el vínculo entre el stock reproductivo y el reclutamiento subsecuente. Murua *et al.*, 2003 Plantean que los datos disponibles son escasos y principalmente se encuentran en especies con fecundidad determinada, lo cual no permiten extrapolar esta experiencia a peces con fecundidad indeterminada. En este sentido Armstrong & Witthames, 2012 señalan la importancia de recabar información de estos parámetros reproductivos, en series de tiempo lo suficientemente grandes, a fin de establecer la influencia de la talla y el control de la atresia en la producción de oocitos. Un resultado relevante en el caso del presente trabajo fue la posibilidad de inter-calibrar el método de Weibel y Gomez, para aplicarlo en las determinaciones de fecundidad y atresia en la sardina monterrey, abriendo con esto la posibilidad hacer accesible datos históricos de parámetros reproductivos que se encuentran contenidos en la colección laminillas de cortes histológicos del Laboratorio de Morfofisiología de CICIMAR-IPN, lo cual puede servir como un caso de estudio que permita extrapolar esta experiencia a peces con fecundidad indeterminada.

La atresia es un proceso degenerativo que se observa en todas las etapas del ciclo reproductivo. En especies con fecundidad indeterminada como las anchovetas y sardinas la mayoría de las veces, la atresia se produce hacia el final de la puesta, donde la producción excedente de oocitos vitelogénicos son reabsorbidos (Wallace & Selman, 1981). La mayoría de los estudios de atresia en anchoas y sardinas se han restringido las cuantificaciones a las primeras etapas de la reabsorción, esto debido

principalmente a la dificultad que implica distinguir las etapas posteriores (Hunter & Macewicz, 1985), La confusión más común es entre los folículos postovulatorios (Fpo's) y la atresia, especialmente con los folículos en atresia beta. Para evitar este problema en el presente trabajo las estimaciones de los índices de atresia se centraron sobre el estadio de atresia α en oocitos con vitelo, además que es la única fase donde las estimaciones por el método de Weibel y Gomez "2D", con los niveles de sesgo presentados en este trabajo son válidas esto debido a que en esta fase la forma del oocito y la distribución de diámetro es igual a los oocitos en estadio de madurez avanzada.

El efecto de la atresia en este estudio se analizó desde dos puntos de vista diferentes; el primero, la afectación de la fecundidad parcial individual por atresia y el segundo la reducción de la producción de oocitos a nivel poblacional.

En cuanto a la afectación de la atresia a nivel individual se observó una tendencia a intensificarse con el transcurso de la temporada de puesta. Se observó una gran variabilidad de este índice entre los individuos. Solo durante marzo se registraron organismos con atresia mayor (organismos con frecuencias de atresia α superiores al 50%). Hunter & Macewicz (1985) mencionan que al llegar a este nivel de reabsorción se reduce la probabilidad de que esas hembras alcancen nuevamente el desove lo anterior es un indicador del final de la temporada de puesta, la frecuencia de organismos con altas intensidades fue baja durante este estudio limitándose a un 5% de las hembras analizadas, lo cual es un indicador que algunas hembras estaban llegando al final de su temporada de puesta. El seguimiento de este índice no se realizó en el mes de abril por el mal estado del material histológico, con el decaimiento de la frecuencia de hembras activas y el aumento de la prevalencia de atresia es posible intuir el final del pico reproductivo para la especie, lo cual pudo haberse visto reflejado en un incremento en el número de hembras con altas intensidades de atresia a nivel individual

A nivel poblacional se encontró una reducción de la fecundidad parcial individual por atresia semejante a los documentados por otros autores; como Hunter *et al.* (1992) quienes encontraron una reducción de la fecundidad del 8% para el lenguado,

Microstomus pacificus; Witthames & Greer Walker (1995) un 12.4% en el lenguado del Mar del Norte (*Solea solea*). En ambos casos principalmente asociado a variaciones en la temperatura fuera de los rangos óptimos, así como del efecto de contaminación ambiental; Greer Walker *et al.* (1994) reportaron una reducción de la fecundidad del 13.6 % en la caballa (*Scomber scombrus*), asociados a deficiencias alimenticias y variaciones de la temperatura fuera de las condiciones óptimas.

También han documentado valores más elevados en la reducción de la fecundidad por atresia como lo que mencionan Kurita *et al.* (2003) en el arenque del Atlántico (*Clupea harengus*), documentan una reducción del 56% por atresia y atribuyen esta reducción al bajo factor de condición de los organismos. Concluyen que la reducción en la producción de oocitos está relacionada con el estado de salud de los peces. Lo anterior es un indicador de que las variables relacionadas con la nutrición de los organismos tienen una fuerte influencia en la reducción de la fecundidad por atresia.

Si bien, en el caso de la sardina monterrey, la reducción de la fecundidad parcial individual por atresia parece ser baja, esta puede llegar a afectar notablemente la estimación de la producción de huevos a nivel de la población. Además la fecundidad depende de otros parámetros reproductivos como son la frecuencia de hembras participantes en la puesta o hembras reproductivamente activas y el tiempo en que este grupo se encuentra disponible para la reproducción (Torres-Villegas, 2007). En este sentido al analizar estos parámetros dentro de una temporada con condiciones normales, puede ser poco significativo, sin embargo, al analizar esto entre temporadas, como la reportada por Torres-Villegas (2007) para la temporada 1999-2000 cuya duración y frecuencia de hembras activas se redujo significativamente además de altas frecuencias de atresia, esta reducción impacta significativamente las estimaciones de la producción de huevos a nivel poblacional.

En cuanto a la intensidad poblacional de atresia α Torres-Villegas (2007), menciona que valores cercanos al 2% en *S. sagax* son normales a lo largo de la temporada de puesta. En el presente trabajo se observaron frecuencias inferiores a este valor durante los meses de enero-febrero. Estas frecuencias de intensidad de atresia α

poblacional, si bien se vieron reflejadas en una reducción en el número de oocitos, esta no fue significativa.

Torres-Villegas (*Op.Cit.*) propone un valor del 5% para la frecuencia de atresia α como indicador del final de la temporada de puesta, en el presente trabajo no se encontraron valores cercanos a lo reportado, lo cual se atribuye a que no fue posible calcular la intensidad de la atresia en el mes de abril, mes en el que se puede inferir que se dio el final del pico reproductivo.

La dificultad para la estimación de la intensidad de atresia se debió a problemas de fijación del material. Sin embargo, dada la relación existente con la prevalencia de atresia, se puede inferir el final del pico ocurrió en el mes de abril, donde la prevalencia fue máxima. Otro indicador del final del pico reproductivo durante abril fue la presencia de los primeros casos de hembras con una intensidad individual de atresia cercana al 50% durante marzo, así como el descenso de la frecuencia de hembras activas y la reducción en la frecuencia de organismos en estadio de madurez avanzada.

Los datos de los índices de atresia y la frecuencia de hembras activas encontrados en la sardina monterrey son coincidentes con dinámica que describen Hunter *et al.* (1992; Pride (1994) y Torres-Villegas (2007) mencionan que la producción neta de oocitos es un compromiso entre la tasa de producción bruta de oocitos y la atresia presente en el ovario, la producción de oocitos es nula cuando la atresia compensa la producción, hasta el momento en que predomina la atresia mayor.

Dado lo anterior es posible describir la relación atresia/producción de oocitos, como una sucesión de poblaciones celulares, en la cual, durante los meses iniciales de la temporada de puesta, la producción de oocitos es máxima y la reabsorción por atresia es mínima. Conforme transcurre la temporada se incrementa la intensidad de atresia α y se reduce la producción de oocitos hasta el momento que la intensidad de atresia y la producción de oocitos alcanzan valores iguales, es el momento en que se presenta el final de la temporada de puesta. Este mecanismo puede explicar la interrupción de la puesta, las cuales han sido documentadas en diferentes especies,

como el caso de *Gadus morhua*, del que se tienen reportes de suspensión de la reproducción (Burton *et al.*, 1997; Rideout *et al.*, 2000). Así mismo se han reportado casos de suspensión de la puesta en *S. sagax* (Torres-Villegas 2007) quien para la temporada reproductiva 1999-2000 realizó el seguimiento de hembras activas y la frecuencias de hembras con atresia mayor, documento una reducción en la duración del pico reproductivo, de cuatro meses a dos meses y una reducción en la frecuencia de hembras activas alrededor del 40% durante el máximo, el cual durante condiciones normales es cercana al 99%.

La dificultad de establecer las causas de la atresia α ha sido documentada, y es atribuida principalmente a la escasa documentación existente de este proceso (Torres -Villegas 2007). La mayor parte de los trabajos presentan descripciones morfológicas (Valdebenito *et al.*, 2011). No obstante, Nagahama (1994), Lambert *et al.*, (2003) mencionan que en la mayoría de los vertebrados la actividad sexual está íntimamente ligada con las condiciones imperantes del medio, el efector de estos estímulos están en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, el cual responde a variaciones específicas puntuales de los factores externos en los ciclos hormonales. Este eje genera respuestas inmediatas a los estímulos que percibe. Una de estas respuestas está en el desarrollo gonadal o en la suspensión de la actividad reproductiva la cual se evidencia por altas frecuencias de atresia.

Dentro de los principales estímulos causantes del proceso de atresia, los más relevantes son los relacionados a la temperatura y la alimentación; Fedorov (1971) y Burton e Idler (1984) asocian la reabsorción de oocitos intraováricos con temperaturas bajas en las masas de agua donde se desarrollan. Estos autores a su vez discuten sobre el efecto de una pobre condición nutricional o inanición al final de la puesta. Otras causas de atresia las discuten Wooton (1973) y Kjesbu *et al.* (1991), ellos analizaron los efectos del hacinamiento en la retención de oocitos maduros en peces juveniles. Beamish *et al.* (1975), señalan la contaminación por metales pesados también puede causar interrupciones de la reproducción.

En el presente trabajo no se midió de forma directa el efecto de cada uno de estos parámetros en la tasa de reabsorción de oocitos, sin embargo, dada la estrecha

relación existente entre el ambiente y el organismo, se asume que el control de la fecundidad por atresia es un mecanismo de respuesta al conjunto de variables ambientales imperantes en un momento dado, principalmente aquellas variaciones relacionadas a la producción de alimento en el ambiente. En este sentido Korta *et al.* (2010) mencionan que el proceso de producción de oocitos puede ser considerada como un modelo de caja negra, donde solo es posible analizar la respuesta final de los organismos al conjunto de variables imperantes en el medio.

Conclusiones.

Para estimar la fecundidad con el objetivo de entender la relación entre la producción de oocitos y el reclutamiento se propone el método del Disector Físico como un método de referencia para validar e inter-calibrar los métodos estereológicos basados en perfiles, a fin de estimar el número de oocitos en las diferentes etapas de desarrollo ovárico a fin de obtener una aproximación al potencial reproductivo.

Para estimar fecundidad con el objetivo de obtener información para satisfacer el modelo para la estimación de la biomasa de la población reproductora, se recomienda el uso de cualquiera de las técnicas para estimar la fecundidad evaluada en el presente trabajo.

Se identificó una de las fuentes de sesgo para el método de Weibel y Gomez (método 2D), se trata del encogimiento asociado al proceso histológico.

En el caso del disector físico (método 3D) la fuente de sesgo en las estimaciones está dada por la dificultad para establecer si dos perfiles ubicados en la misma coordenada “ x , y ” de un disector, corresponden a una sola partícula o a dos distintas, la cual es producido por el efecto de la densidad de partículas y la profundidad del disector.

Se propone una estrategia para reducir el sesgo en las estimaciones por el disector.

Las calibraciones de los métodos para estimar la fecundidad parcial individual, en la sardina monterrey, son reproducibles y precisos con respecto al método de referencia.

Las técnicas estereológicas son una herramienta que hace posible la determinación de parámetros reproductivos de temporadas pasadas, de las que sólo se cuenta con información en colecciones histológicas.

La prevalencia de atresia α tiende a incrementar conforme avanza la temporada de puesta.

La intensidad de atresia poblacional durante la temporada estudiada, permaneció dentro de los niveles normales.

Existe una sucesión de poblaciones celulares entre la atresia poblacional y la tasa de producción de oocitos.

La reducción de la fecundidad parcial evidencia el control de la producción de oocitos por el proceso de atresia.

Recomendaciones.

1. Para la estimación de parámetros reproductivos como la fecundidad e índices de atresia, se recomienda utilizar técnicas de tinción que permitan un máximo contraste como el caso de la técnica de Hematoxilina-Eosina, para la aplicación de técnicas estereológicas asistidas por procesamiento digital de imágenes..
2. Una de las características de las técnicas que se analizan es que permiten hacer un seguimiento preciso del efecto de la atresia en el reclutamiento de oocitos de un grupo a otro, lo cual debe integrarse a lo largo de la temporada con observaciones repetidas a lo largo de la temporada de puesta. Lo anterior es muy importante en estimaciones del Potencial Reproductivo en especies como la sardina monterrey que tienen fecundidad indeterminada.”
3. La calidad del material biológico, desde la obtención de las muestras hasta las observaciones al microscopio, deben cumplir con la calidad máxima para intentar valorar el Potencial Reproductivo en peces con fecundidad indeterminada”.
4. Para evitar el sesgo introducido por efecto de alineación deficiente entre los planos del disector físico se recomienda incluir puntos de referencia en las inclusiones en los cortes histológicos.
5. Si se emplean las técnicas estereológicas para la estimación de la densidad de oocitos en estadios menos avanzados, se recomienda hacer una evaluación del sesgo introducido por encogimiento por proceso histológico.
6. Para comprender de mejor manera la relación atresia/tasa de producción de oocitos, es necesario generar información consecutiva en series largas de tiempo que permitan este análisis.
7. Con la finalidad de comprender de mejor manera el proceso de atresia se recomienda realizar estudios donde se haga el seguimiento de las tasas de producción fecundidad y atresia en relación con la condición de las hembras (medir el efecto materno en las tasas de producción de oocitos).
8. En el manejo de las pesquerías, para tener una idea más clara de la relación entre stock reproductivo y el reclutamiento subsecuente, es pertinente llevar a

cabo la evaluación rutinaria de los parámetros reproductivos como la fecundidad, el potencial reproductivo y su variación.

Bibliografía.

- Alarcon, V.H., S.R. Goldberg & J. Alheit.1984. Histología de los folículos post-ovulatorios de la sardina (*Sardinops sagax*) del Perú. *Boletín del Instituto Mar Perú-Callao*. 8(1): 5-14.
- Armstrong, M.J. & P.R. Witthames. 2012. Developments in understanding of fecundity of fish stocks in relation to egg production methods for estimating spawning stock biomass. *Fish res.* 117– 118: 35– 47.
- Aragon, L., Aranda, G., Santos, & A., Medina. 2010. Quantification of ovarian follicles in bluefin tuna *Thunnus thynnus* by two stereological methods. *J. Fish Biol.* 77, 719–730
- Aranda Garrido 2013, Estudio sobre la reproducción de atún rojo. Tesis Doctoral Universidad de Cádiz. España
- Aranda, G., Aragon, L., Santos, A., & A. Medina. 2009. Counts of postovulatory follicles with the stereological disector method as a proxy of the realized fecundity in bluefin tuna, *Thunnus thynnus*. In: Wyanksi, D., Brown-Peterson, N.J. (Eds.), Proceedings of the 4th Workshop on Gonadal Histology of Fishes. El Puerto de Santa Maria, Spain, pp. 133–136,
- Bakun, A.1985. Comparative studies and the recruitment problem: searching for generalizations. *Calcofi Coop. Ocenic fish. Invest. Rep* 26:30-40
- Begega A., R.M, Miranda, S. Rubio, L.J. Santin, M. Cuesta & J.L. Arias. 1998. Aplicaciones de la Estereología en Psicobiología. *Rev. Elect. Met. Apl*, 3(1). 30-40.
- Beverton, R.J.H. & S.J. Holt .1957. On the dynamics of exploited fish populations. *Fish. Invest. Ser. 2 Mar. Fish. G.B. Minist. Agric. Fish. Food* No.19: 533 p
- Burton, M.P. y D.R. Idler. 1984. The reproductive cycle in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). *Can. J. Zool.* 62: 2563-2567.

- Burton, M.P., R.M. Penney & S. Biddiscombe. 1997. Time course of gametogenesis in Northwest Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Can J Fish Aquat Sci* 54 (Suppl. 1): 122-131.
- Carmo Do Silva J.P., Da Costa M.R., Gomes .I D. & F.G. Araújo. 2016. Gonadal development and fecundity of the smooth weakfish *Cynoscion leiarchus* (Teleostei: Perciformes: Sciaenidae) in a tropical Brazilian bay. *ZOOLOGIA* 33(6)
- Chambers, R.C. & E.A. Trippel. 1997. Early life history and recruitment in fish populations. *Fish and Fisheries Series 21*. London: Chapman and Hall. xxxii: 596 pp.
- Cisneros-Mata M.A., M.O. Nevárez-Martínez & M.G. Hammann. 1995. The rise and fall of the Pacific sardine, *Sardinops sagax caeruleus* Girard, in the Gulf of California, Mexico. *Calif. Coop. Oceanic Fish. Invest. Rep.* , 36: 136-143.
- Clark, F.N. 1936. Interseasonal and intraseasonal changes in size of the California sardine. *California Division of Fish and Game, Bureau of Commercial Fisheries Fish Bulletin No. 47*, 26p.
- COSEWIC. 2002. Assessment and update status report on the Pacific sardine *Sardinops sagax* in Canada. Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. Ottawa. 26pp.
- Cooper, D.V., Pearson, K.E. and Gunderson, D.R. 2005. Fecundity of shortspine thornyhead (*Sebastolobus alascanus*) and longspine thornyhead (*S. altivelis*) (*Scorpaenidae*) from the northeastern Pacific Ocean, determined by stereological and gravimetric techniques. *Fish. Bull.* 103: 15-22
- Coward, K. and Bromage, N.R. 2002, Stereological point-counting; an accurate method for assessing ovarian function in tilapia. *Aquaculture* 212, 383-401
- Csirke, J., 1980. Introducción a la dinámica de poblaciones de peces. FAO. Doc. Téc. Pesca: (192):82 p.

- Csirke, J.1988. Small Shoaling Pelagic Fish Stock. *In: Fish population Dynamics* (second Edition) J. A. Gulland (ed) John Willey and Sons Ltd 271-302 pp
- Delesse, M.A. 1847. Procède mecanique pour determiner la composition des roches. *Comptes rendus hebdomadaires des sances del Academie des Sciences*, Paris. 25:544-545.
- De Vlaming, V.L., G. Grossman & F. Chapman. 1982. On the use of the gonadosomatic index. *Comp. Biochem. Physiol.* 73 A: 31-39
- Durazo, R. y T.R. Baumgartner, 2002. Evolution of oceanographic conditions off Baja California, 1997-1999. *Progress in Oceanography.* 54: 7-31
- Emerson, L.S., M. Greer Walker & P.R. Witthames.1990. A stereological method for estimating fish fecundity. *J. Fish Biol.* 36 (5): 721-730.
- FAO. 2003. La ordenación pesquera. 2. El enfoque de ecosistemas en la pesca. *FAO Orientaciones Técnicas para la Pesca Responsable.* No. 4, Supl. 2. Roma, FAO. 2003. 133p
- FAO 2017. Glosario de términos pesqueros. Consulta en línea 19 de mayo del 2017. < <http://www.fao.org/fi/glossary/default.asp>>
- Félix-Uraga, R. 2006. *Dinámica poblacional de la sardina del pacífico Sardinops sagax (Jenyns 1842) (clupeiformes: clupeidae), en la costa oeste de la península de Baja California y el sur de California.* Tesis Doctoral, Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas).
- Fedorov K. Y. 1971. The state of the gonads of the Barents Sea Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides* (Walbaum)) in connection with failure to spawn. *J. Ichthyol.* 11: 673-682.
- Ganias, K. 2014. *Biology and ecology of sardines and anchovies.* CRC Press. Boca Raton Florida. 382p.

- Ganias K., H. Murua, G. Claramunt, R. Dominguez-Petit, P. Gonçalves, F. Juanes, J. Keneddy, N. Klibansky, M. Korta, Y. Kurita, S. Lowerre-Barbieri, G. Macchi, M. Matsuyama, A. Medina, C. Nunes, G. Plaza, R. Rideout, S. Somarakis, A. Thorsen, A. Uriarte & M. Yoneda. 2014. Chapter 4: Egg production, 109 pp. In *Handbook of applied fisheries reproductive biology for stock assessment and management*, ed. R. Domínguez-Petit, H. Murua, F. Saborido-Rey and E. Trippel. Vigo, Spain. Digital CSIC. <http://hdl.handle.net/10261/87768>.
- Ganias K., T. Vavalidis, C. Nunes & Y. Stratoudakis. 2008. Automating batch fecundity measurements using digital image analysis systems: a case study in the Iberian sardine. Nantes, 24-28/11/2008: International Council for the Exploration of the Sea Working Group on Acoustic and Egg Surveys for Sardine and Anchovy in ICES Areas VIII and IX.
- Gaxiola-Castor G. & R. Durazo 2010. *Dinámica del ecosistema pelágico frente a Baja California, 1997-2007*. Secretaria del Medio ambiente y Recursos Naturales. México D.F. 501pp.
- Greer Walker, M., P.R. Witthames & I. Bautista De Los Santos. 1994. Is the fecundity of mackerel (*Scomber scombrus*: *Scombridae*) determinate? *Sarsia* 79, 13–26
- Grier H, 2000. Ovarian Germinal Epithelium and Folliculogenesis in the Common Snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). *J. Morphol.* 243:265–28
- Gundersen, A.C., K.H. Nedreaas, O.S. Kjesbu & O.T. Albert. 2000. Fecundity and recruitment variability of Northeast Arctic Greenland halibut during 1980-1998, with emphasis on 1996-1998. *J. of Sea Res.* 44 (1-2):45-54.
- Gundersen, H.J., P. Bagger, T.F. Bendtsen, S.M. Evans, L. Korbo, N. Marcussen, Moller A., K. Nielsen., J.R. Nyengaard., B. Pakkenberg., F.B. Sørensen., A. Vesterby & M.J. West. 1988. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in

pathological research and diagnosis. *Acta Pathologica Microbiologica et Inmunologica Scandinavica*. 96 (1-6): 379-394

Hernández-Lopez, A. 2003. *Edad, crecimiento y reproducción de la Sardina Monterrey (Sardinops caeruleus) de Bahía Magdalena, B.C.S. durante 1981 a 1985*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 65 pp.

Hjort, J. (1914). *Fluctuations in the great fisheries of northern Europe viewed in light of biological research*. Rapp. P.-v. Reun. Cons. perm. int. Explor. Mer 20: 1-228

Humason, G.L. 1979. *Animal tissue techniques*. Fourth edition. San Francisco USA: W. H. Freeman and Company. 661 pp.

Hunter, J.R., Lo, N.C.H., Leong, R.J.H., 1985. Batch fecundity in multiple spawning fishes. In: Lasker, R. (Ed.), *An Egg Production Method for Estimating Spawning Biomass of Pelagic Fish: Application to the Northern Anchovy, Engraulis mordax*. U.S. Department of Commerce. NOAA Technical Report, NMFS 36, pp. 67–77.

Hunter, J.R. & S. Goldberg. 1980. Spawning incidence and batch fecundity in northern anchovy, *Engraulis mordax*. *Fish. Bull.* 77(3): 641-652.

Hunter, J.R. & B.J. Macewicz. 1980. Sexual Maturity, Bath Fecundity, Spawning Frequency and Temporal Pattern of Spawning for the Northern Anchovy, *Engraulis mordax*, During the 1979 Spawning Season. *Calif. Coop. Oceanic Fish. Invest. Rep.* 21, 139-149

Hunter, J.R. & B.J. Macewicz. 1985. Rates of atresia in the ovary of captive and wild Northern anchovy, *Engraulis mordax*. *Fish. Bull.* 83(2): 119-135.

Hunter, J.R., B.J. Macewicz, N.C.H. Lo & C.A. Kimbrell. 1992. Fecundity spawning, and maturity of females dover sole *Microstomus pacificus* with an evaluation of assumption an precision. *Fish. Bull.* 90(1): 101-128.

- Klibansky, N. & F. Juanes. 2007. Species-specific effects of four preservative treatments on oocytes and ovarian material of Atlantic cod (*Gadus morhua*), haddock (*Melanogrammus aeglefinus*), and American plaice (*Hippoglossoides platessoides*). *Fish. Bull.* 105(4): 538–547.
- Kjesbu, O.S., J. Klungsoyr, H. Kryvi, P.R. Witthames & M. Greer Walker. 1991. Fecundity, atresia, and egg size of captive Atlantic cod (*Gadus morhua*) in relation to proximate body composition. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 2333–2343
- Kjesbu O.S., M. Fonn, B.D. Gonzáles & T. Nilsen. 2010. Stereological calibration of the profile method to quickly estimate atresia levels in fish. *Fish Res* 104:8–18
- Korta, M. & H. Murua, 2009, Quantification of Seasonal Follicular Cycle of an Indeterminate Fish: the European Hake Model. *In Proceedings of the 4th Workshop on Gonadal Histology of fishes*. Session 3: 158-161.
- Korta, M., H. Murua, Y. Kurita & O.S. Kjesb. 2010. How are the oocytes recruited in an indeterminate fish? Application of stereological techniques along with advanced packing density theory on European hake (*Merluccius merluccius* L.). *Fisheries Res.* 104: 56-63
- Kurita, Y. & O.S. Kjesbu. 2009. Fecundity estimation by oocyte packing density formulae in determinate and indeterminate spawners: Theoretical considerations and applications. *J. of Sea Res.* 61 (2009): 188–196
- Kurita, Y., S. Meier & O.S. Kjesbu. 2003. Oocyte growth and fecundity regulation by Atresia of Atlantic herring (*Clupea harengus*) in Relation to Body Condition Throughout the Maturation Cycle. *J. Sea Res.* 49 (2003) 203-219.
- Lambert, J.G.D. 1970. The ovary of the guppy, *Poecilia reticulata*. The atretic follicle, a corpus atreticum or a corpus luteum praecovulationis. *Zeitschrift für Zellforschung* 107: 51-67.

- Lambert Y. (2008). Why should we closely monitor fecundity in marine fish populations? *J. Northwest Atl. Fish. Sci.* 41: 93-106
- Lambert Y, Yaragina NA, Kraus G, Marteinsdottir G, Wright PJ (2003) Using environmental and biological indices as proxies for egg and larval production of marine fish. *J. Northwest Atl. Fish. Sci.* 33: 115-159.
- Lasker R.(ed.). 1985. *An egg production method for estimating spawning biomass of pelagic fish: application to the northern anchovy, Engraulis mordax*. La Jolla California: NOAA Technical Report NMFS. 36: 1-99.
- Lluch-Belda D., Crawford R.J.M., Kawasaki T., MacCall A.D., Parrish R.H., Schwartzlose R.A. & Smith P.E. (1989) Worldwide fluctuations of sardine and anchovy stocks: the regime problem. *S Afr J Mar Sci.* 8:195–205
- Lo, N.C.H, J.R. Hunter, H.G.. Moser, P.E. Smith, & R.D. Methot. 1992. The daily fecundity reduction method: A new procedure for estimating adult fish biomass. *ICES J. Mar. Sci.* 49: 209–215.
- Lockwood, S.J., Nichols, J.H., Dawson, W.A., 1981. The estimation of a mackerel (*Scomber scombrus* L.) spawning stock size by plankton survey. *J. Plankton Res.* 3: 217–233
- Lowerre-Barbieri, S.K. 2009. Reproduction in relation to conservation and exploitation of marine fishes. Pages 371–394 in B. G. M. Jamieson, editor. *Reproductive biology and phylogeny of fishes (agnathans and bony fishes)*, volume 9, part B. Science Publishers, Enfield, New Hampshire
- Macchi G. 1993. Estimación de la fecundidad parcial del corno (*Odontesthes smitti*) mediante los métodos gravimétrico y estereométrico. *Rev. Biol. Mar., Valparaíso.* 28 (2): 349-357.
- Macchi, G.J. & Diaz J.M. 1996. Ciclo reproductivo y fecundidad del lenguado *Paralichthys patagonicus* Jordan, en Jordan y Gooss 1889. *Rev. Invest. Des. Pesq.* 10: 73-83.

- Macías D., L. Lema, M.J. Gómez-Vives, J.M. Ortiz de Urbina & J.M. de la Serna 2006. Some biological aspects of small tunas (*Euthynnus alletteratus*, *Sarda sarda* & *Auxis rochei*) from the South Western Spanish Mediterranean traps. *Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT*, 59(2): 579-589
- Mandarim-de-Lacerda C.A. (2003). Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 75(4): 469-486.
- Mandarim-de-Lacerda CA & CV Penteado. (1988). Topographical and morphometrical study of the atrioventricular junctional area of the cardiac conduction system in the *Macaca fascicularis* Raffles, 1821. *Anatomischer Anzeiger*. 167: 57-61.
- Marshall C.T., L. O'Brien, J. Tomkiewicz, F.W Köster, G. Kraus, G. Marteinsdottir, M.J. Morgan, F. Saborido-Rey, J.L. Blanchard, D.H. Secor, P.J. Wright, N.V. Mukhina & H. Björnsson. (2003). Developing alternative indices of reproductive potential for use in fisheries management: Case studies for stocks spawning an information gradient. *J. Northwest Atl. Fish. Sci* 33: 161–190
- Marshall, T.C., O.S. Kjesbu, N. A. Yaragina, P. Solemdal, & Ø. Ulltang. 1998. Is spawning stock biomass a sensitive measure of the reproductive potential of Northeast Arctic cod? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55:1766–1783
- Mayhew TM. (1991). The new stereological methods for interpreting functional morphology from slices of cells and organs. *Exp Physiol.*, 76: 639-665.
- McGregor, J.S. 1957. Fecundity of the Pacific *Sardine Sardinops carulea*. *Fish. Bull.* 57(121): 427-428.
- Medina, A., Abascal, F.J., Megina, C. & A. García. 2002. Stereological assessment of the reproductive status of female Atlantic northern bluefin tuna, *Thunnus thynnus* (L.), during migration to Mediterranean spawning grounds through the Strait of Gibraltar. *J. Fish Biol.* 60: 203–217

- Meseguer Lloret S. (2016). *Ensayos estadísticos para la comparación de las pendientes de 2 rectas de calibrado*. València. Universitat Politècnica de València. Escola Politècnica Superior de Gandia. Departament de Química. Recuperado el 21 de abril de 2017.
- Munro, A. D. 1990. *Reproductive seasonality in teleost: enviromental influences*. I General Introduction. (Ed: Munro, A.D.; Scott, A.P y Lam, T.J.) CRC Press Inc. Boca raton Florida. 2- 11 pp.
- Murua, H., G. Kraus, F. Saborido-Rey, P.R. Witthames, A. Thorsen & S. Junquera. 2003. Procedures to estimate fecundity of marine fish species in relation to their reproductive strategy. *J. Northwest Atl. Fish. Sci.*33: 33–54
- Nagahama, Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int J. Dev. Biol.* 38: 217-229.
- Ochoa-Báez R.I. & J.R. Torres-Villegas. 2007. *Instructivo para procesamiento de muestras biológicas de sardinas adultas*. La Paz BCS: Instituto Politécnico Nacional. CICIMAR-IPN.
- Parker, K. 1980. A direct method for estimating northern anchovy, *Engraulis mordax*, spawning biomass. *Fishery Bulletin U.S.* 78: 541-544.
- Parrish, R.H., R. Serra & W.S. Grant. 1989. The monotypic sardines, *Sardina* and *Sardinops*: Their taxonomy, distribution, stock structure, and zoogeography. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46: 2019-2036
- Pérez, N. & Figueiredo. 1992. First approach to the study of atresia in the ovary of sardine, *Sardina pilchardus* (Walb.). *Bol. Lnst. Esp. Ocenogr.* 8(I). 1992: 191-199
- Pérez-Olvera O., S. Arellano Balderas, & H.A. Rodríguez Martínez. 2002. Revisión de los métodos estereológicos y su aplicación en biología celular. *Patología Revista latinoamericana* 50: 2.

- Pertusa Grau, J.F.2003. Técnicas de análisis de imagen aplicaciones en biología. Valencia España: Universidad de Valencia.
- Pride, I. (Coord). 1994. *Spawning biology, distribution an abundance of mackerel, Scomber scombrus. And horse mackerel, Tracgurus trachurus in the North east atlantic.* A final report to the direttore general for fisheries (DG XIV) of the commission of the European communities. 164 pp
- Rideout, R.M.P., M. Burton & G.A. Rose. 2000. Observations on mass atresia and skipped spawning in Northern Atlantic cod, from Smith Sound, Newfoundland. *J. Fish Biol.* 57: 1429-1440.
- Saber, S., M.J., Gómez Vives, J.C., Báez, D., Godoy & D. Macías. 2011. Estimating batch fecundity of the Mediterranean albacore. A comparison between quantification of postvitellogenic follicles and postovulatory follicles. *Collect. Vol. Sci. Pap. ICCAT.* 66(5): 1919-1930
- Saborido-Rey F., O.S. Kjesbu & A. Thorsen, 2003, Buoyancy of Atlantic cod larvae in relation to developmental stage andmaternal influences. *J. of plankton res.* 25(3) 291-308
- Saborido-Rey, F.2008. *Ecología de la reproducción y potencial reproductivo en peces marinos.* Curso doctoral. Instituto de investigaciones marinas. (CISC) Universidad de Vigo España.71pp
- Saborido-Rey F., H. Murua, & G. J Macchi. 2011 I Iberoamerican Symposium on Reproductive Ecology, Recruitment and Fisheries. *Ciencias Marinas*, Vol. 37, No. 4B, 2011
- Saborido-Rey F. & E. A. Trippel 2013. Fish reproduction and fisheries. *J. Fish Res.* 138: 1-4
- SAGARPA. 2012. *Acuerdo por el que se da a conocer el Plan de Manejo Pesquero para la Pesquería de Pelágicos.* México D.F. Consulta en línea 01/11/2015

<http://www.inapesca.gob.mx/portal/documentos/publicaciones/pelagicos/PlanManejoPelMen.pdf>

SAGARPA. 2014. *Anuario estadístico de pesca y acuacultura 2014*. CONAPESCA 2014. Consulta en línea 01/11/2015.

<http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_anuario_estadistico_d_e_pesca>

SAGARPA. 2014. *Ley General de Pesca y Acuacultura Sustentables*. CONAPESCA 2017. Consulta en línea 01/08/2017.

<http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LGPAS_190617.pdf>

Salgado, A.G., B. Vásquez & M. del Sol. 2011. Estereología de la glándula tiroides humana. *Int. J. Morphol*, 29(2); 562-567.

Santamaría-Solis, L., E. Serna-Cuellar & I. Ingelmo-Ingelmo. 2013. Aplicación de técnicas estereológicas para la cuantificación del tejido adiposo. *Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana*, 39 (supl. 1): 74-81

Schwartzlose RA, Alheit J, Bakun A and 18 others. (1999). Worldwide large scale fluctuations of sardine and anchovy populations. *S. Afr. J. Mar. Sci.* 21:289–347

Scott,B.E., G.marteinsdottir, G.A. Begg,P.J. Wrigth & O.S.Kjesbu. 2006. Effects of population size/age structure, condition and temporal dynamics of spawning on reproductive output in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Ecol Model.* 191:383-415.

Stratoudakis,Y.,M. Bernal, K. Ganiias & A. Uriarte.2006. The Daily Egg Production Method (DEPM): recent advances, current applications and future challenge. *Fish Fish.* 7 :35-57.

- Smith, P.E. & H.G. Mosser. 1988. CALCOFI time series: an overview of fishes. *Calif. Coop. Fish. Invest. Rep.* 29: 66- 77.
- Sokal, R.R. & F.J. Rohlf. 1995. *Biometry: principles and practice of statistics in biological research*. 4th edition New York: W.H. Freeman and Company 915pp.
- Solemdal, P. 1997. Maternal effects: A link between the past and the future. *J. Sea Res.* 37: 213–227.
- Sterio, D.C. 1984. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J. Microsc.* 134 (2): 127-136.
- Stratoudakis, Y., Bernal, M., Ganias, K., Uriarte, A., 2006. The daily egg production method: recent advances, current applications and future challenges. *Fish Fish.* 7: 35–57.
- Thorsen A., C.T. Marshall & O.S. Kjesbu. 2006. Comparison of various potential fecundity models for North-East Arctic cod *Gadus morhua* L. using oocyte diameter as a standardizing factor. *J. Fish Biol.* 69: 1709–1730.
- Torres-Villegas, J.R. 1986. *Evaluación de la biomasa reproductora 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. 116pp.
- Torres-Villegas, J.R., R.I. Ochoa-Báez, L. Perezgómez & G. García-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: 255-264.
- Torres-Villegas, J.R.; R.I. Ochoa-Báez; L. Perezgómez & G. García Melgar. 2002. Effect of the atresia major in the Pacific sardine (*Sardinops caeruleus*) of Bahia Magdalena in the 1999-2000 season. *North Pacific Transitional Areas International Symposium*. La Paz, B.C.S. Mexico. April. 23-25 pp.

- Torres-Villegas, J.R., R.I. Ochoa-Báez & G. García-Melgar. 2006. Programa de muestreadores a bordo PROMA instructivo 2006 CICIMAR-IPN. 42pp.
- Torres-Villegas, J.R., R.I. Ochoa-Báez, L. Perezgomómez-Álvarez & G. García-Melgar. 2007. Estimaciones de atresia mayor en la temporada reproductiva 1999-2000 en la sardina monterrey (*Sardinops sagax*) en Bahía Magdalena, México. *Rev. de Biol. Mar. y Oceanogr.* 42(3): 299 – 310.
- Tsinganis, M.,K. Gantias & C. Nunes. 2012. The effect of temperature on the prevalence of ovarian atresia in sardine, *Sardina pilchardus*. *Proc 10th symposium on oceanography & fisheries*, Athens, Greece.
- Trujillo-Millán O. 2009. *Dinámica del reclutamiento en peces de arrecife rocoso del suroeste del Golfo de California*. Tesis de Doctorado, CICIMAR-IPN. 118pp.
- Tyler, C. R. y J. R. Sumpter. 1996. Oocyte Growth and developmet in the teleosts. *Reviews in Fish Biology and Fisheries.* 6: 287- 318.
- Valdebenito, I., L. Paiva, M. Berland. 2011. Atresia folicular en teleósteos: una revisión. *Arch med vet* 43, 11-25
- Valdez-Montiel U.F.2012. *Efecto de la atresia ovárica en la fecundidad de la sardina monterrey (Sardinops sagax) (Jenyns, 1842), capturada en la pesquería de Ensenada B.C. México*. Tesis de Licenciatura en Biología marina Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz BCS. 108p.
- von Bartheld, C.S. 2002. Counting particles in tissue sections: Choices of methods and importance of calibration to minimize biases. *Histol Histopathol.* 17(2): 639-648.
- Wallace, R.A. & K. Selman. 1981. Cellular and dynamics aspects of oocyte growth in teleosts. *Amer. Zool.* 21: 325-343
- Weibel, E.R. 1979. *Stereological methods. 1. Practical methods for biological morphometry*. London: Academic Press. 915pp

- Weibel, E.R. & D.M. Gomez, 1962. A principle for counting tissue structures on random sections *J. Appl. Physiol.* 17 (2): 343-348.
- Weibel, E.R., G.S. Kistler & W.F. Scherle. 1966. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol.* 30(1): 23-38.
- Whitehead, P.J.P. 1985. *Clupeoid fishes of the world (suborder Clupeioidi) and annotated and illustrated catalogue of herrings, sardines, pilchards, sparts, anchovies and wolfherrings part I: chirocentridae, clupeidae and pristigasteridae.* Rome Italy FAO 303 pp.
- Witthames, P. R., & C. T. Marshall. 2008. The importance of reproductive dynamics in fish stock assessments. *In: Advances in fisheries science: 50 years on from Beverton and Holt* (Eds. A. Payne, J. Cotter, and T. Potter), p. 306–324. Blackwell Publ., Oxford, U.K.
- Witthames, P.R. & M. Greer Walker. 1995. Determinacy of fecundity and oocyte atresia in sole (*Solea solea*) from the Channel, the North Sea and the Irish Sea. *Aquat. Living Resour.* 8: 91– 109.
- Witthames, P.R., Thorsen, A., Murua, H., Saborido-Rey, F., Greenwood, L.N. Dominguez .M. Korta., & Kjesbu, O.S., 2009. Advances in methods for determining fecundity: application of the new methods to some marine fishes. *Fish. Bull.* 107: 148–164.
- Wootton, R.J. 1973. The effect of food ration on egg production in the female three-spined stickback, *Gasterosteus aculeatus* L. *J. Fish Biol.* 5: 89-96.