

3.3.3.- Datos morfométricos (LC y PT)

Las biometrías obtenidas de los ejemplares utilizados indicaron un incremento, tanto en la LC como en el PT, a medida que avanzó el proceso de maduración. Se observó que los organismos en estadio I midieron en promedio 26.7125 mm de LC, mientras que los del estadio IV midieron 35.329 mm, a este respecto se determinó la existencia de diferencias significativas en cuanto a los valores promedio. Las hembras de estadios I y IV difirieron significativamente ($F=19.0738$; $P<0.05$) de acuerdo a la prueba de Duncan con los estadios II y III.

De manera similar, el peso total del animal se incrementó de 8.3146 gr a 13.395 gr en promedio del estadio I al IV respectivamente ($F=14.3321$; $P<0.05$). Se observó una diferencia significativa en el peso promedio del estadio I que difirió del resto (Duncan, $P<0.05$) formándose 2 subconjuntos en los cuales no se presentaron diferencias significativas, el II-III y el III-IV. En la Tabla 3.7, se muestra la relación de los valores de ambos parámetros para cada uno de los estadios.

Tabla 3.7.- Datos morfométricos por estadio gonadal de hembras de *P. clarkii*.

Estadio	(n) Ejemplar	LONGITUD DEL CEFALOTORAX (mm)				PESO TOTAL (gr)			
		Máximo	Promedio	Mínimo	Desviación Estándar	Máximo	Promedio	Mínimo	Desviación Estándar
I	48	44	26.7125	12	7.3243	19.1	8.3146	2.7	3.5176
II	108	48	31.9012	21	5.8823	30.7	10.829	3.1	4.1516
III	65	48.5	33.1031	19.5	6.486	37.5	12.296	4.4	5.0467
IV	69	44	35.329	20	5.41	25.5	13.395	6.4	4.5193

El análisis de regresión de PT en función de LC fue significativo ($F=187.849$; $P<0.05$) (Fig. 3.6). El coeficiente de regresión (b) fue 1.125, de acuerdo a este valor el crecimiento de PT fue alométrico negativo ($t=22.86$; $P<0.05$).

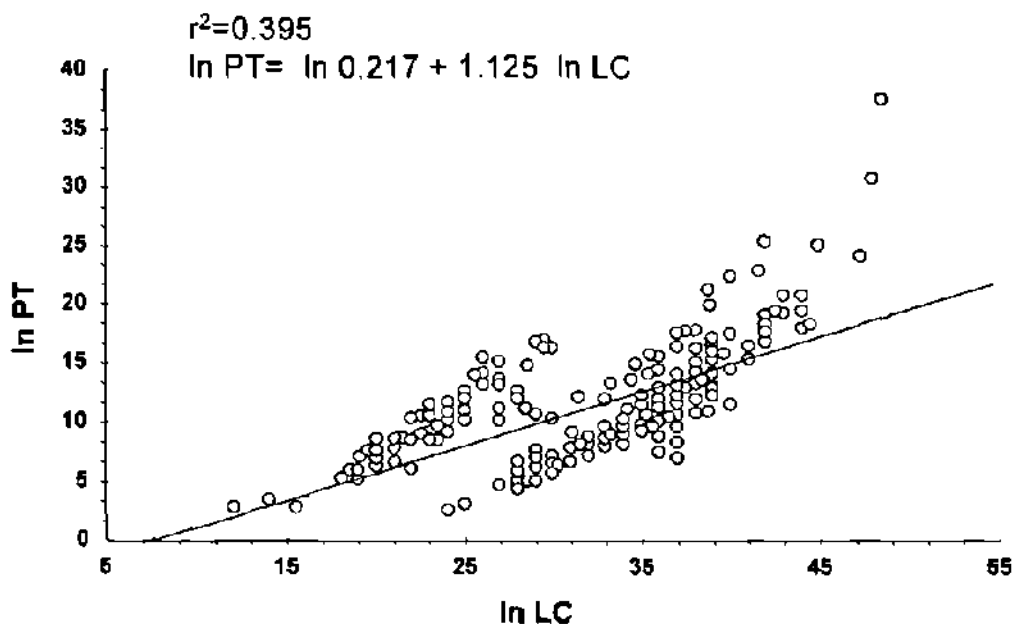


Fig. 3.6.- Relación de PT y LC de las hembras colectadas en 1998

3.3.4.- Peso del ovario

El peso del ovario es uno de los parámetros biométricos necesarios para determinar el Índice Gonadosomático, los valores máximos y mínimos fueron 0.0043 y 1.4819 g, respectivamente. Se realizó un ANOVA que permitió el establecimiento de diferencias significativas ($F= 71.1241$; $P< 0.05$), así como una prueba de Duncan con un 95% de confianza, por medio de la cual quedó de manifiesto que los estadios III y IV son los que marcan la diferencia respecto a los demás. Los pesos de las gónadas aumentaron de acuerdo a la evolución de los estadios de maduración gonadal (Tabla 3.8).

Los valores promedio del peso gonadal fueron mayores en Diciembre (0.3577) y Enero (0.4864), esto es sin considerar el estado gonadal. El valor promedio mínimo se presentó en Mayo (0.0458). Estos valores fueron significativamente diferentes de acuerdo a un ANOVA ($F= 7.7379$; $P< 0.05$), y se determinó que los valores promedio de los meses de Enero, Julio, Agosto, Octubre y Diciembre, fueron significativamente diferentes al resto, de acuerdo a la prueba de Duncan con un 95% de confianza (Tabla 3.9).

Tabla 3.8.- Valores del peso ovárico para cada estadio gonadal.

Estadio	Número de ejemplares	Máximo	Promedio	Mínimo	Desviación Estándar	Coefficiente de variación (CV)
I	48	0.1630	0.0262	0.0043	0.0278	106.1068
II	108	0.2370	0.0441	0.0079	0.0326	73.9229
III	65	1.1337	0.1521	0.0213	0.2115	139.05325
IV	69	1.4819	0.4695	0.0710	0.3625	77.2097

Tabla 3.9.- Datos del peso del ovario de las hembras recolectadas durante 1998.

Mes	Número de Ejemplares	Máximo	Promedio	Mínimo	Desviación Estándar	Coefficiente de variación
Enero	15	1.4002	0.4864	0.6640	0.5457	112.19161
Febrero	25	0.5568	0.0735	0.0043	0.1080	146.93877
Marzo	26	0.4220	0.0514	0.0062	0.0877	170.62256
Abril	35	0.2667	0.0474	0.0084	0.0553	116.6666
Mayo	36	0.3961	0.0458	0.0140	0.0674	147.16157
Junio	21	0.1808	0.0510	0.0266	0.0499	97.84313
Julio	21	0.8680	0.2582	0.0209	0.2741	106.15801
Agosto	31	0.9059	0.2918	0.0237	0.2908	99.65729
Septiembre	19	0.7248	0.1761	0.0433	0.1746	99.14821
Octubre	20	1.1337	0.2149	0.0129	0.2692	125.26756
Noviembre	20	0.8430	0.1914	0.0063	0.2102	109.82236
Diciembre	21	1.4819	0.3577	0.0133	0.4588	128.2639

El coeficiente de regresión ($b=1.872$) obtenido de la regresión del POV en función de PT fue significativo ($F=156.877$; $P<0.05$), pero el coeficiente de determinación fue muy bajo $r^2= 0.353$ (Fig. 3.7). El crecimiento de POV fue alométrico negativo ($t= 7.570$; $P<0.05$).

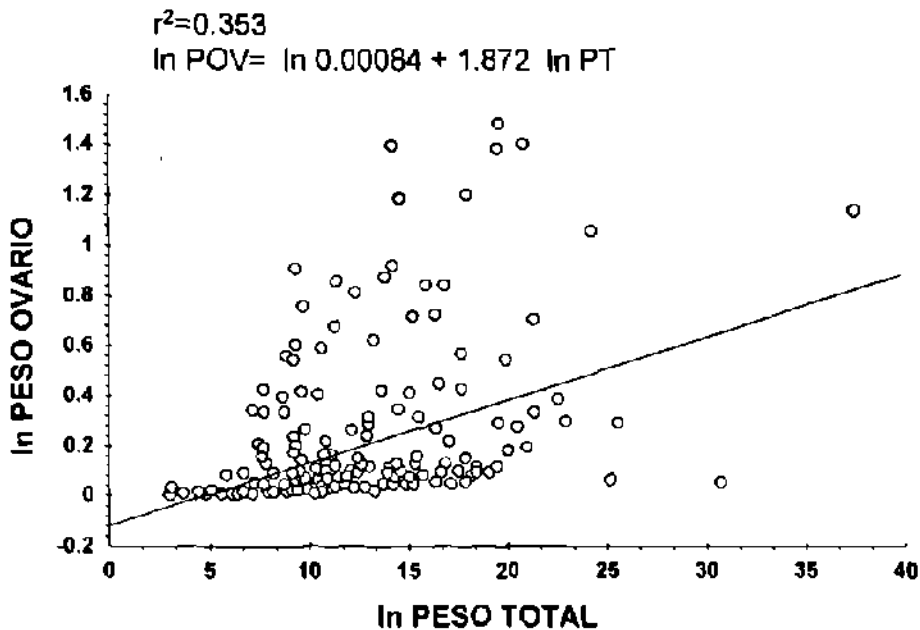


Fig. 3.7.- Relación de POV y PT de las hembras colectadas en 1998

3.3.5.- Índices Gonadosomáticos (IGS)

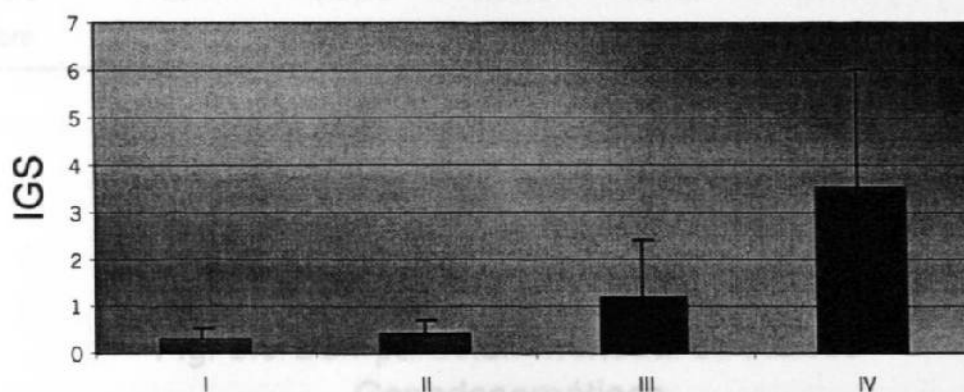
3.3.5.1.- IGS por estadio gonadal

Los valores promedio de IGS fueron diferentes en cada estadio (Tabla 3.9), los cuales se incrementaron hacia el estadio IV (3.5565). Estos datos fueron analizados con un ANOVA y se determinaron diferencias significativas en los distintos estadios de maduración ($F = 88.4532$; $P < 0.05$). De acuerdo a la prueba de Duncan, los IGS se agrupan en tres subconjuntos, uno formado por los IGS de los estadios I y II, los cuales no presentan diferencias significativas, un segundo subconjunto que incluyó solo al IGS del estadio III y el tercer subconjunto formado por el IGS del estadio IV, por lo tanto el IGS de los estadios III y IV difirieron entre sí y con el subconjunto formado por el estadio I y II (Tabla 3.10 y Fig. 3.8).

Tabla 3.10.- Valores del Índice Gonadosomáticos por estadio gonadal.

Estadio	No. Ejemplares	Máximo	Promedio	Mínimo	Desviación Estándar	Coefficiente de variación (CV)
I	48	1.4685	0.2878*	0.0951	0.2227	77.38012
II	108	2.5761	0.4117*	0.0775	0.2880	69.95384
III	65	6.1973	1.1604**	0.2173	1.2560	108.23853
IV	69	9.7923	3.5565***	0.6042	2.4635	69.26753

Fig. 3.8 Índices Gonadosomáticos por estadio gonadal.



3.3.5.2.- IGS mensual

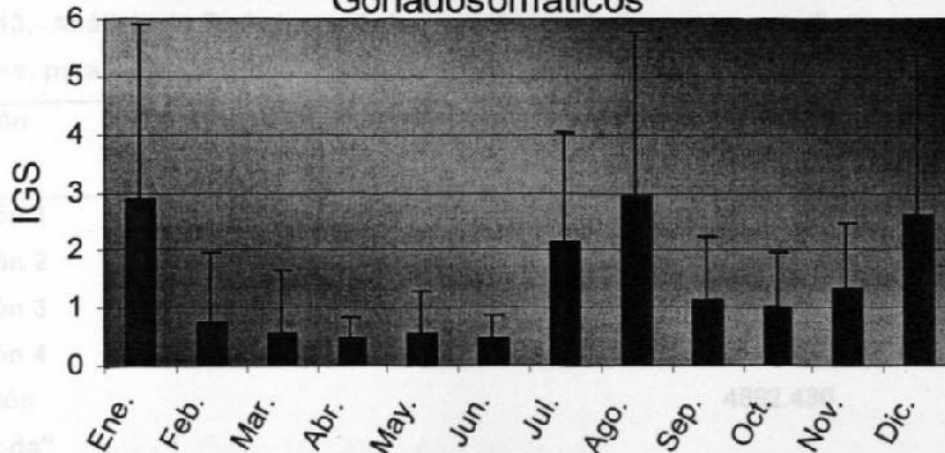
Los IGS mensuales, sin considerar el estadio gonadal, presentaron diferencias significativas a lo largo del ciclo anual, registrándose los valores promedio más altos durante los meses de Diciembre-Enero y Julio-Agosto (2.6154, 2.8645, 2.155 y 2.9204, respectivamente). Todos los valores promedio fueron significativamente diferentes de acuerdo a un ANOVA con una $F = 8.5582$; $P < 0.05$. Además, se realizó una prueba de Duncan con un 95% de confianza, observándose que los meses de Diciembre, Enero, Julio y Agosto, marcaron una diferencia significativa con respecto al resto (Tabla 3.11 y Fig. 3.9).

3.3.6. Índice Gonadal Relativo (IGR)

Tabla 3.11.- Índices Gonadosomáticos por mes de colecta.

Mes	Número de Ejemplares	Máximo	Promedio	Mínimo	Desviación estándar	Coefficiente de Variación (CV)
Enero	15	8.1075	2.8645	0.4232	3.0662	107.04136
Febrero	25	6.3273	0.7222	0.0951	1.2270	169.89753
Marzo	26	5.4805	0.5376	0.0775	1.1120	206.84523
Abril	35	1.9833	0.4401	0.1377	0.3981	90.45671
Mayo	36	4.6058	0.5455	0.1968	0.7544	138.29514
Junio	21	1.6587	0.4749	0.1100	0.3850	81.06969
Julio	21	7.4833	2.1550	0.4644	1.8850	87.47099
Agosto	31	9.7409	2.9204	0.3825	2.8550	97.76058
Septiembre	19	4.4466	1.1508	0.1834	1.0870	94.45603
Octubre	20	3.2000	1.0156	0.1265	0.9684	95.3525
Noviembre	20	5.0179	1.3099	0.2333	1.1730	89.54882
Diciembre	21	9.7923	2.6154	0.1919	2.7210	104.03762

Fig. 3.9 Comparación mensual de Índices Gonadosomáticos



3.3.6. Índice Gonadal Relativo (IGR)

La comparación múltiple de las pendientes (b) obtenidas entre W (Peso del ovario) y S (Diferencia entre el peso somático menos y el peso del ovario) permitió determinar la ausencia de diferencias significativas entre los cuatro estadios gonadales ($F=0.0474$; $P>0.05$) (Tabla 3.12).

Tabla 3.12.- Ecuaciones y valores de a y b obtenidas de la relación W (Peso del ovario) en función de S (Peso de la hembra - Peso del ovario).

Estadio gonadal	Ecuación	Hipótesis y Decisión
I	$W=0.00104 S^{1.4203}$	$H_0: b_1 = b_2 = b_3 = b_4$ Se acepta H_0 $F=0.0474$; $P>0.05$
II	$W=0.00424 S^{0.9277}$	
III	$W=0.00573 S^{1.1606}$	
IV	$W=0.05980 S^{0.7047}$	

Al no existir diferencias entre los coeficientes de regresión, se utilizó un ANCOVA para calcular el coeficiente de regresión común que tuvo un valor de 1.084 (Tabla 3.13).

Tabla 3.13.- Análisis de Covarianza de la regresiones de los cuatro estadios gonadales, para calcular el coeficiente de regresión común.

Relación	ΣX^2	ΣXY	ΣY^2	n	B	SC Residual	G.L. Residual
Regresión 1	9.139	12.981	1561.242	48	1.4203	1542.8041	46
Regresión 2	14.797	13.728	2421.454	108	0.9277	2408.718	106
Regresión 3	8.531	9.902	759.940	65	1.1606	748.447	63
Regresión 4	7.478	5.270	196.174	69	0.7047	192.460	67
Regresión "combinada"						4892.430	282
Regresión común	39.947	41.882	4938.811		1.0484	4894.900	
Regresión Total				290			288

Considerando los anteriores análisis para obtener un coeficiente de regresión (b) común, la ecuación para determinar los IGR de cada estadio gonadal quedaría de la siguiente manera (Tabla 3.14):

Tabla 3.14.- Ecuación del $IGR = a W/S^b$ para cada estadio gonadal.

Estadio gonadal	Ecuación
I	$IGR = 0.00104 W/S^{1.0484}$
II	$IGR = 0.00424 W/S^{1.0484}$
III	$IGR = 0.00573 W/S^{1.0484}$
IV	$IGR = 0.05980 W/S^{1.0484}$

Los valores mínimos y máximos del IGR fueron 0.0000009 y 0.005822, respectivamente, esto es sin considerar el estadio gonadal. Los valores promedio por estadio gonadal se presentan en la Tabla 3.15. De acuerdo al ANOVA y la prueba de Duncan, los valores promedio de los estadios I, II y III no difirieron entre ellos, sin embargo, difirieron significativamente con el valor promedio del estadio IV ($F=137.5096$; $P<0.05$).

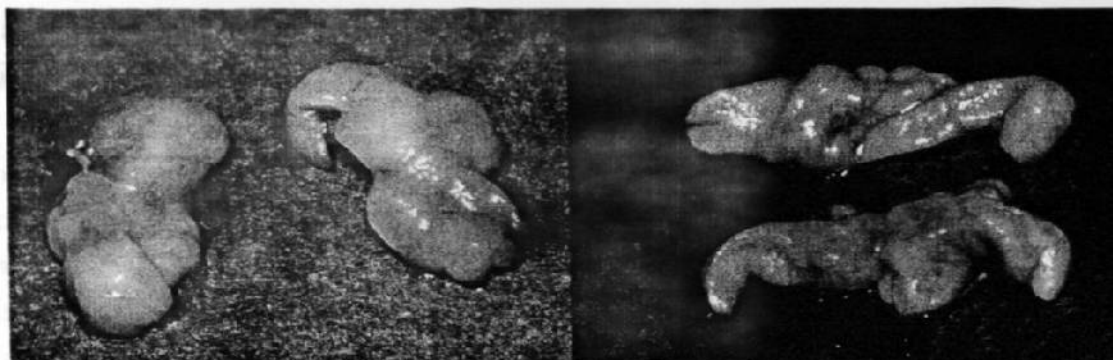
Tabla 3.15.- Valores del índice gonadal relativo (IGR) por estadio gonadal.

Estadio	No. Ejemplares	Máximo	Promedio	Mínimo	Desviación Estándar	Coefficiente de variación (CV)
I	48	0.1380^{-04}	0.0000027	0.900^{-06}	0.000002089	74.07
II	108	0.1008^{-03}	0.0000157	0.290^{-05}	0.000011225	71.33
III	65	0.3381^{-03}	0.0000606	0.112^{-04}	0.000067827	111.88
IV	69	0.5822^{-02}	0.0019855	0.322^{-03}	0.00143857	72.45

3.3.7. Color y Peso del Hepatopáncreas.

El hepatopáncreas presentó una coloración que varió de acuerdo al estadio gonadal de las hembras, las tonalidades fueron verde-café para el estadio I, amarillo claro para el estadio II y III, mientras que para el estadio IV fue de un

color amarillo fuerte. En la siguiente figura se presenta el hepatopáncreas de hembras del tercer y cuarto estadio gonadal.



Hepatopáncreas de hembras estadio III Hepatopáncreas de hembras estadio V

Los pesos máximos y mínimos del hepatopáncreas fueron 0.1038 y 1.9710. Los valores promedio del peso del hepatopáncreas (PH) agrupados por estadio gonadal presentaron una tendencia de incremento del estadio I al III, para decrecer en estadio IV (Tabla 3.16). De acuerdo al ANOVA y a la prueba de Duncan estos valores fueron diferentes entre el estadio I y II, y ambos difirieron con los estadios III y IV, en estos dos últimos no se encontraron diferencias significativas ($F=24.922$; $P<0.05$).

Tabla 3.16.- Valores del peso del hepatopáncreas (PH) para cada estadio gonadal.

Estadio	Número de ejemplares	Máximo	Promedio	Mínimo	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación (CV)
I	48	0.8448	0.3979	0.1038	0.1669	41.9452
II	105	0.9686	0.5188	0.2299	0.1525	29.3947
III	63	1.9710	0.6997	0.1370	0.2894	41.3605
IV	69	1.4700	0.6745	0.2831	0.2494	36.9755

Los valores del PH agrupados por mes de muestreo indicaron que en Octubre y Noviembre se presentaron los valores máximos y mínimos absolutos, respectivamente. Mientras que, Mayo y Octubre se observaron los valores promedio mínimo (0.4391) y máximo (0.8033), respectivamente (Tabla 3.17).

Estos promedios de acuerdo al ANOVA y la prueba de Duncan fueron subclasificados en 5 grupos que no presentaron diferencias significativas.

Tabla 3.17.- Datos del peso del hepatopáncreas (PH) por mes de recolección.

Mes	Número de Ejemplares	Máximo	Promedio	Mínimo	Desviación Estándar	Coefficiente de variación
Enero	15	0.9882	0.7009	0.4258	0.1816	25.9095
Febrero	25	0.8863	0.5575	0.1442	0.2095	37.5784
Marzo	22	1.1035	0.5783	0.2024	0.2112	36.5208
Abril	35	0.8207	0.4896	0.2375	0.1540	31.4542
Mayo	35	0.7985	0.4391	0.2299	0.1370	31.2001
Junio	21	0.9012	0.5052	0.1634	0.1698	33.6104
Julio	21	0.8447	0.5316	0.2784	0.1561	29.3641
Agosto	31	0.8151	0.4818	0.1370	0.1437	29.8256
Septiembre	19	1.1660	0.7259	0.3379	0.2392	32.9521
Octubre	20	1.9710	0.8033	0.2333	0.4022	50.0684
Noviembre	20	1.4700	0.7232	0.1038	0.3274	45.2710
Diciembre	21	1.5810	0.6425	0.2997	0.2609	40.6070

El coeficiente de regresión ($b=0.875$) de la relación del PH vs. PT fue significativo ($F=797.334$; $P<0.05$) (Fig. 3.10). La correlación existente entre ambas variables fue de 0.738. El crecimiento de PH fue alométrico negativo ($t=68.54$; $P<0.05$).

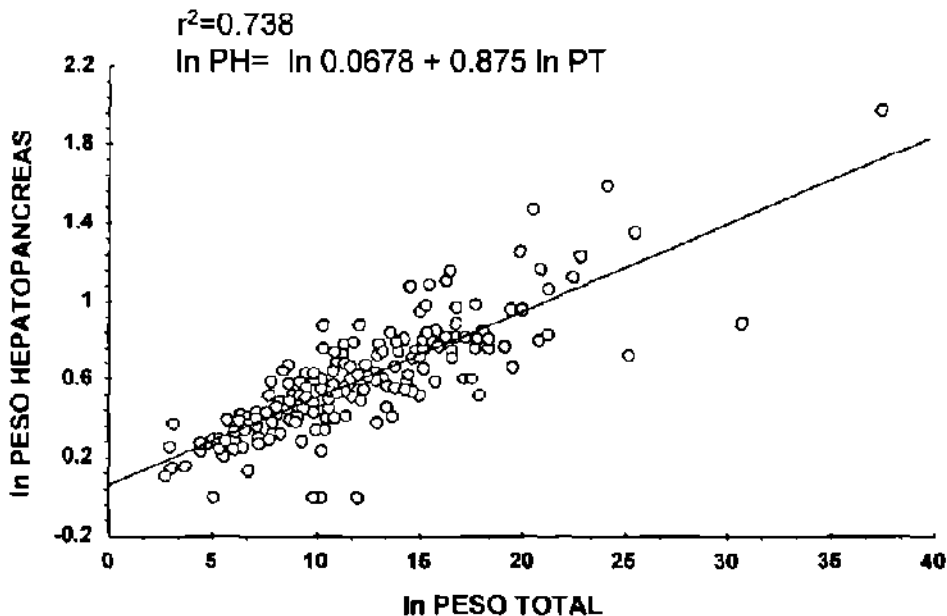


Fig. 3.10.- Relación de PH y PT de las hembras colectadas en 1998

El análisis de regresión de los valores absolutos del POV y PH sin considerar el estadio gonadal fue significativo de acuerdo al ANOVA ($F=132.976$; $P<0.05$), sin embargo, el valor del coeficiente de determinación ($r^2=0.320$) fue muy bajo (Fig. 3.11). El crecimiento de POV fue alométrico negativo ($t=8.33$; $P<0.05$).

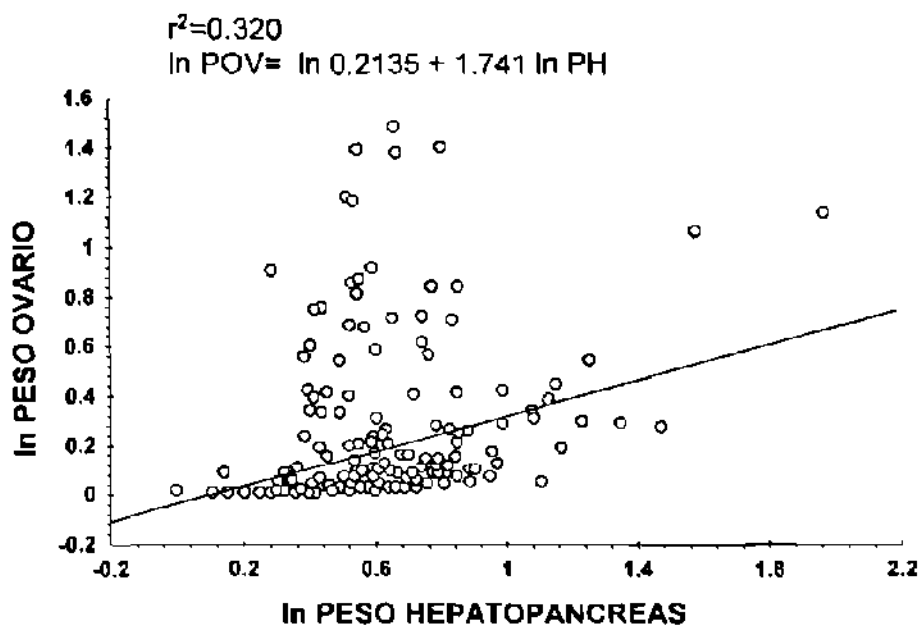


Fig. 3.11.- Relación de POV y PH de las hembras colectadas en 1998

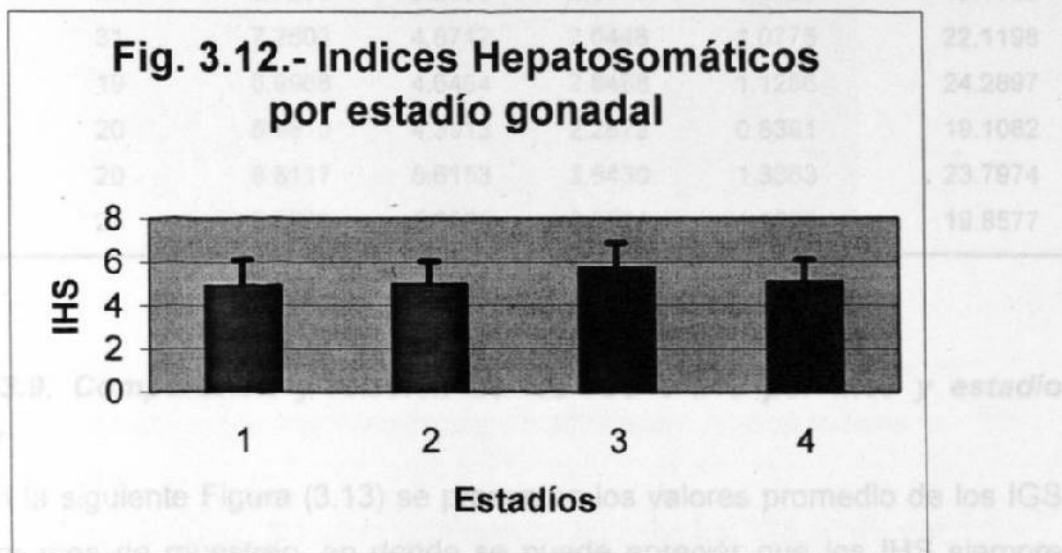
3.3.8. *Indices Hepatosomáticos (IHS)*

3.3.8.1.- *Indices Hepatosomáticos por estadio gonadal*

El rango de los Indices Hepatosomáticos (IHS) fue de 2.044 a 11.864 en las hembras examinadas. Se observó una tendencia de incremento en los valores promedio de los tres primeros estadios (4.914- 5.741), para disminuir este valor en el estadio IV. De acuerdo al ANOVA y la prueba de Duncan, los IHS de los estadio I,II y IV difieren significativamente con el IHS del estadio III ($F=7.759$; $P<0.05$) (Tabla 3.18 y fig. 3.12).

Tabla 3.18.- Valores de los Índices Hepatosomáticos (IHS) por estadio gonadal.

Estadio	Número de ejemplares	Máximo	Promedio	Mínimo	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación (CV)
I	48	8.5345	4.9140	2.2873	1.1792	23.9967
II	105	11.8645	4.9855	2.8488	1.0693	21.4481
III	63	8.5117	5.7410	2.0448	1.1323	19.7230
IV	69	7.1707	5.1079	2.8609	1.0039	19.6538



3.3.8.2.- Índices Hepatosomáticos mensuales

Los IHS promedio por mes, sin considerar el estadio gonadal, fueron en Enero (4.366) y en Diciembre (5.959), los valores mínimo y máximo, respectivamente (Tabla 3.19). Por medio del análisis de varianza y la prueba de Duncan se determinaron 5 subgrupos de IHS mensuales, donde cada grupo difirió significativamente de los demás grupos ($F=4.373$; $P<0.05$).

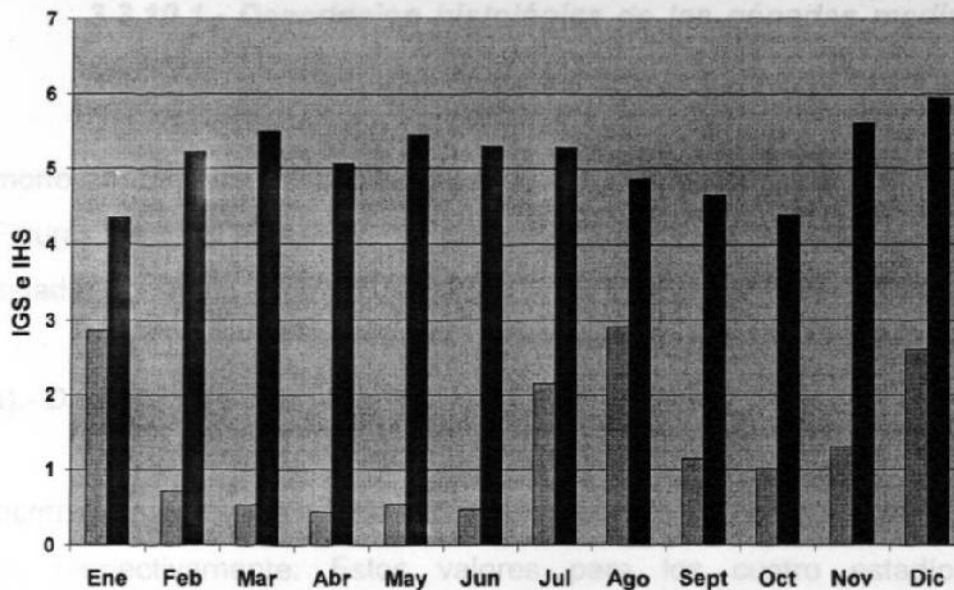
Tabla 3.19.- Valores de los Indices Hepatosomáticos por mes de recolección.

Mes	Número de Ejemplares	Máximo	Promedio	Mínimo	Desviación Estándar	Coefficiente de variación
Enero	15	5.7655	4.3465	2.8609	0.7528	17.3196
Febrero	25	7.4462	5.2787	3.5380	1.1292	21.3916
Marzo	22	8.5345	5.5005	3.6800	1.0645	19.3527
Abril	35	7.0058	5.0694	3.5827	0.8894	17.5444
Mayo	35	11.8645	5.4564	3.9583	1.3027	23.8747
Junio	21	6.4582	5.2961	4.3243	0.5201	9.8204
Julio	21	6.7299	5.2903	2.9473	1.0125	19.1388
Agosto	31	7.2603	4.8712	2.0448	1.0775	22.1198
Septiembre	19	6.9968	4.6464	2.8488	1.1286	24.2897
Octubre	20	5.3810	4.3913	2.2873	0.8391	19.1082
Noviembre	20	8.5117	5.6153	3.5430	1.3363	23.7974
Diciembre	21	7.7826	5.9599	3.3724	1.1835	19.8577

3.3.9. Comparación y relación de los IGS e IHS por mes y estadio gonadal

En la siguiente Figura (3.13) se presentan los valores promedio de los IGS e IHS por mes de muestreo, en donde se puede apreciar que los IHS siempre presentaron valores más altos que los IGS.

Fig. 3.13.- INDICES GONADOSOMATICOS (IGS) EN AZUL E INDICES HEPATOSOMATICOS (IHS) EN ROJO PARA HEMBRAS COLECTADAS EN 1998



De acuerdo al análisis de regresión entre IGS e IHS, sin considerar el estadio gonadal, no existió una relación significativa entre ambos índices ($F=0.344$; $P>0.05$).

En la Tabla 3.20, se presenta una comparación de los IGS e IHS por estadio gonadal, en donde se observa que los valores del IHS fueron más altos que los del IGS.

Tabla 3.20.- Valores promedio y desviación estándar de los IGS e IHS por estadio gonadal de las hembras de *Procambarus clarkii*, colectadas en 1998.

ESTADIOS	IGS				IHS	
	n	X	n	X		
I	58	0.2878 (0.2227)	58	4.9140 (1.1793)		
II	133	0.4117 (0.2880)	130	4.9855 (1.0693)		
III	92	1.1604 (1.2560)	90	5.7410 (1.1324)		
IV	85	3.5565 (2.4635)	85	5.1080 (1.0040)		

3.3.10. - Histología gonadal

3.3.10.1.- Descripción histológica de las gónadas mediante la técnica de H y E

Usando esta técnica se lograron determinar las principales características morfo-anatómicas de los ovocitos en sus diferentes estadios gonadales. En las Figuras de la 3.15 a 3.17, se presentan microfotografías de ovocitos de distinto estadio gonadal.

a).- Diámetro de ovocitos

Los diámetros promedio de los ovocitos mostraron una tendencia hacia el incremento que varió desde 170.9149 μm hasta 760.6388 μm para los estadios I y IV, respectivamente. Estos valores para los cuatro estadios presentaron diferencias significativas de acuerdo al ANOVA ($F= 85.0275$; $P< 0.05$) y la prueba de Duncan, donde se observó que el diámetro de los ovocitos de los estadios I y IV difirió de los del tercer y cuarto estadio. Sin embargo, cabe resaltar que los rangos máximos y mínimos absolutos presentaron un traslape en cada estadio (Tabla 3.21 y Fig. 3.14).

Tabla 3.21.- Diámetros de los ovocitos por estadio gonadal (en μm).

Estadio gonadal	N	Máximo	Promedio	Mínimo	Desviación estándar	Coefficiente de Variación
I	31	343.6176	170.9149	22.1689	69.5631	40.70043
II	33	509.8842	324.1359	210.6044	82.9035	25.57677
III	34	620.7286	394.8017	210.6044	104.6243	26.50046
IV	45	1285.7950	760.6388	243.8577	247.949	32.59746

Fig. 3.14.- Comparación del diámetro de los ovocitos por estadio gonadal.

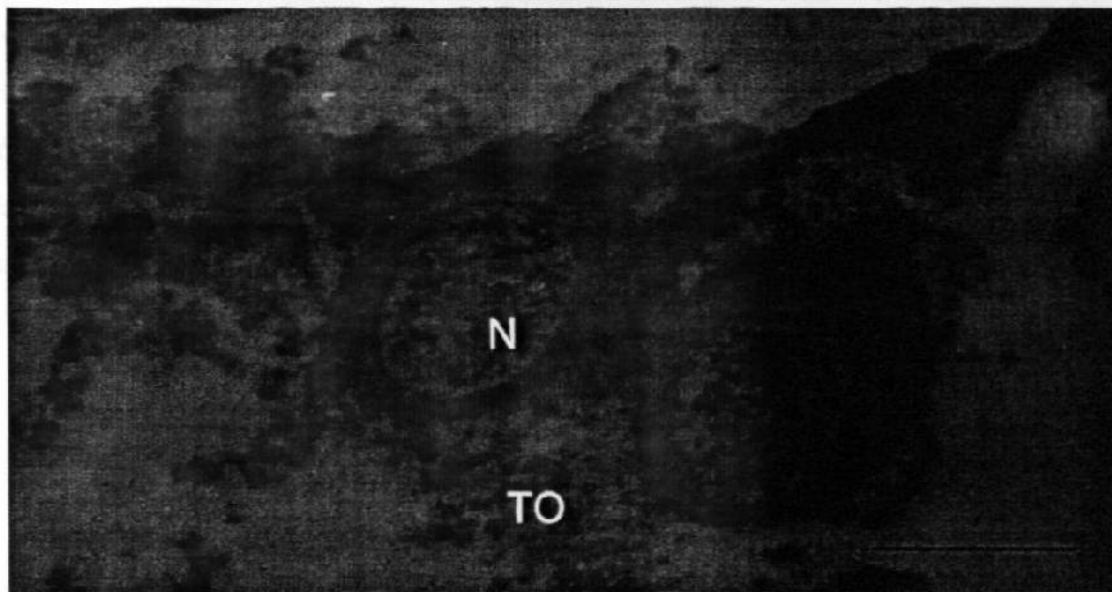
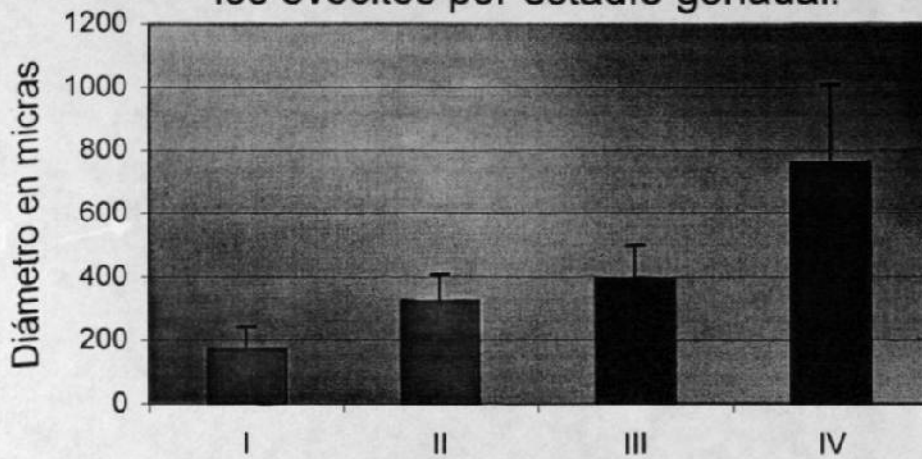


Fig. 3.15.- Cortes transversales (10 X) de ovario en Estadío I donde se puede observar el Núcleo (N) y Tejido ovárico (TO) (Hematoxilina de Harris y Eosina). Barra de calibración = 77.6 μm .

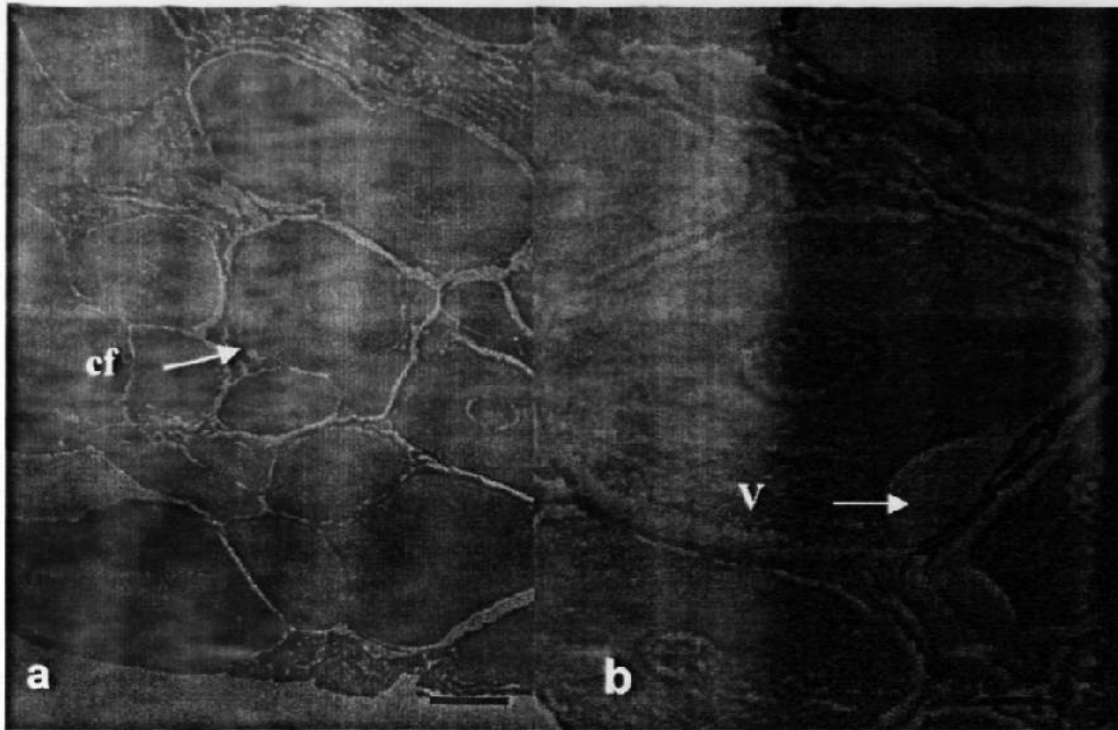


Fig. 3.16.- Corte transversal de ovario, a) Estadío II (4.1X).- La flecha indica las células foliculares (Cf) alrededor del ovocito (barra de calibración = 129.65 μm); b) Estadío III (10X.- ovocito con vacuola (V), característica distintiva de este estadío (Barra de calibración = 52.6402 μm), (Hematoxilina de Harris y Eosina).

Los valores promedio del diámetro de los núcleos se incrementaron del estadio gonadal I al II, pero se presentó un decremento del estadio II al III. Al analizar los datos mediante un ANOVA ($F= 5.0233$; $P<0.05$) se encontraron diferencias significativas, siendo el estadio III el que difirió del IV, de acuerdo a la prueba de Duncan, sin embargo encontramos un traslape entre los rangos de los últimos estadios gonadales (Tabla 3.22 y Fig. 3.18).

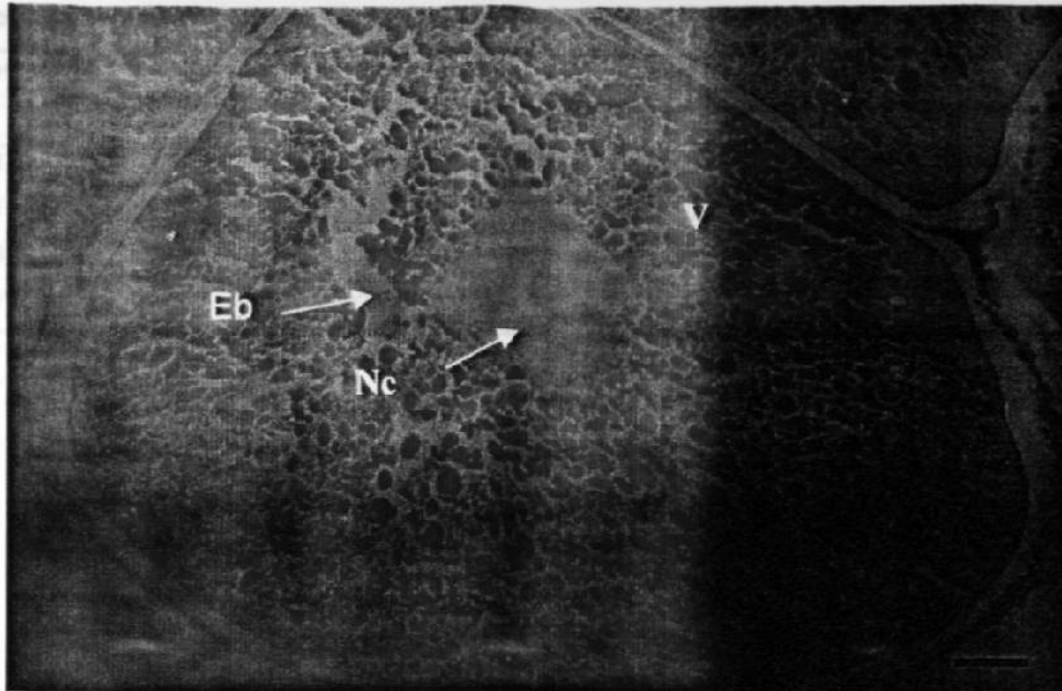


Fig. 3.17.- Corte de ovario (10 X) en Estadío IV: Se observan los nucleolos (Nc), algunas gotas de vitelo (V) y la presencia de espacios blancos (Eb) intracelulares como una característica de reabsorción del ovario (Hematoxilina de Harris y Eosina). Barra de calibración = 60.8511 μm .

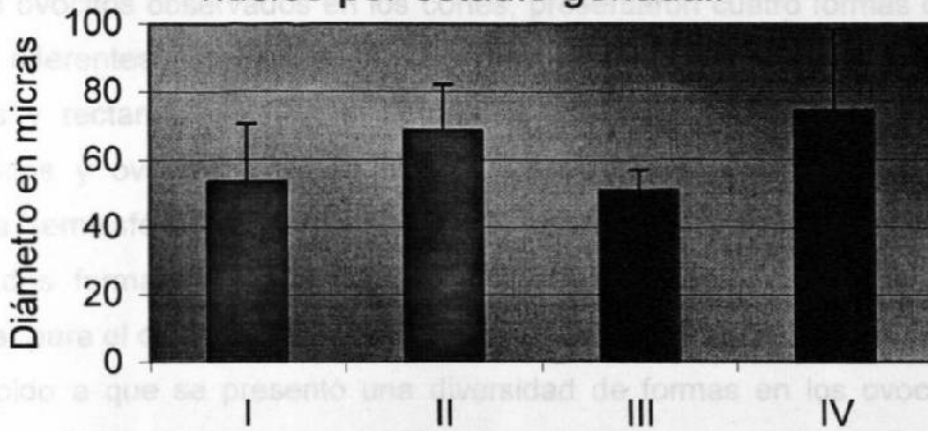
b).- Diámetros de los núcleos

Los valores promedio del diámetro de los núcleos se incrementaron del estadio gonadal I al II, pero se presentó un decremento del estadio II al III. Al analizar los datos mediante un ANOVA ($F= 5.0233$; $P<0.05$) se encontraron diferencias significativas, siendo el estadio III el que difirió del IV, de acuerdo a la prueba de Duncan, sin embargo encontramos un traslape entre los rangos de los distintos estadios gonadales (Tabla 3.22 y Fig. 3.18).

Tabla 3.22.- Diámetro de los núcleos por estadio gonadal.

Estadio	n	Máximo	Promedio	Mínimo	Desviación estándar	Coefficiente de Variación
I	31	84.015	53.4805	16.803	17.1473	32.06271
II	33	103.6185	68.5698	42.0075	13.6681	19.93311
III	29	64.4115	50.98841	39.207	6.098	11.95958
IV	29	126.025	74.53783	33.606	24.0441	32.25757

Fig. 3.18.- Comparación del diámetro del núcleo por estadio gonadal.



Al igual que en el diámetro de los ovocitos y los núcleos, la relación núcleo/citoplasma también presentó un incremento a medida que avanzaba el proceso de maduración gonadal. Tal como lo muestra la Tabla 3.23. Se presentó una relación núcleo/citoplasma de 1:3 como la mínima relación para el estadio I, mientras que la mayor relación se presentó en el estadio IV siendo para este de 1:10.

Tabla 3.23.- Relación núcleo/citoplasma en los diferentes estadios gonadales.

Estadio	Relación núcleo/citoplasma
I	1:3
II	1:5
III	1:7
IV	1:10

c).- Forma de los ovocitos

Los ovocitos observados en los cortes, presentaron cuatro formas distintas entre los diferentes estadios gonadales, siendo estos semiesféricos, ovoides, cuadrados y rectangulares. En el estadio I, solamente se observaron células semiesféricas y ovoides, para el estadio II se presentaron todas las formas excepto la semiesférica, mientras que en el estadio III y IV se presentaron las primeras dos formas, además de la forma cuadrada para el estadio III y la rectangular para el estadio IV. (Tabla 3.24 y Figs. 3.19 y 3.20).

Debido a que se presentó una diversidad de formas en los ovocitos por estadio gonadal, se seleccionaron los que presentaran un mayor tamaño y abundancia en los cortes revisados.

Tabla 3.24.- Comparación de las formas de los ovocitos para cada estadio gonadal.

Estadio gonadal	Forma del ovocito			
	Semiesférico	Ovoide	Cuadrado	Rectangular
I	*	*		
II		*	*	*
III	*	*	*	
IV	*	*		*



Fig. 3.19.- Formas de los ovocitos por estadio gonadal.

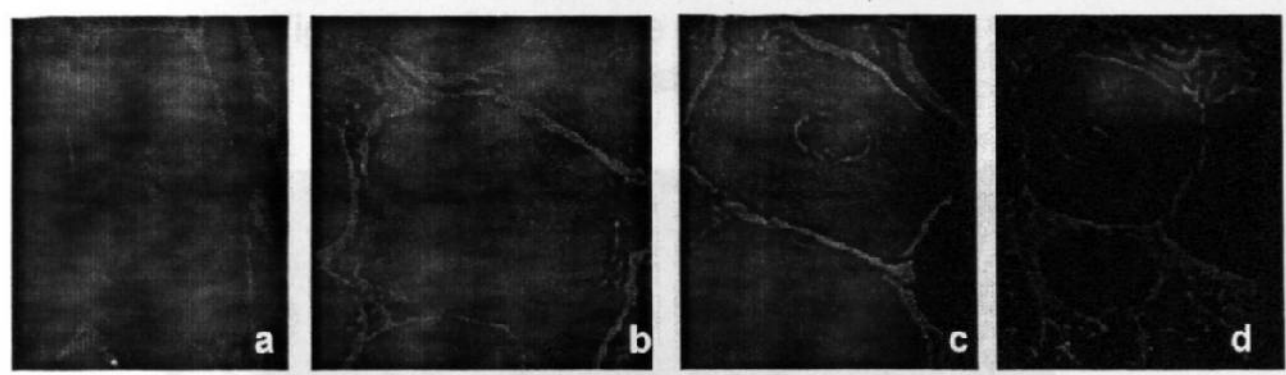


Fig. 3.20.- Cortes de ovario (10 X) con ovocitos de diferentes formas que se presentaron en diversos estadios. a) ovoide, b) semiesférico, c) rectangular y d) cuadrado. (a, Acido Periodico- Reacción de Schiff; b, c y d Hematoxilina de Harris y Eosina).

d).- Número de nucleolos Kulkarni et al. (1991), es la presencia de una vacuola

El número mínimo de nucleolos por estadio fue similar (2-4), sin embargo, el número máximo varió en los distintos estadios. En el estadio I, se cuantificaron 13 nucleolos, mientras que para el estadio IV se lograron observar hasta 23. Los

valores promedio fueron evaluados por medio de un ANOVA y se encontraron diferencias significativas entre estos ($F= 4.5161$; $P< 0.05$). Por medio de una prueba de separación de medias se pudieron clasificar en tres grupos: 1) Estadio I (13); 2) estadio II (19) y III (20); 3) y estadio IV (23). (Tabla 3.25 y Fig. 3.21).

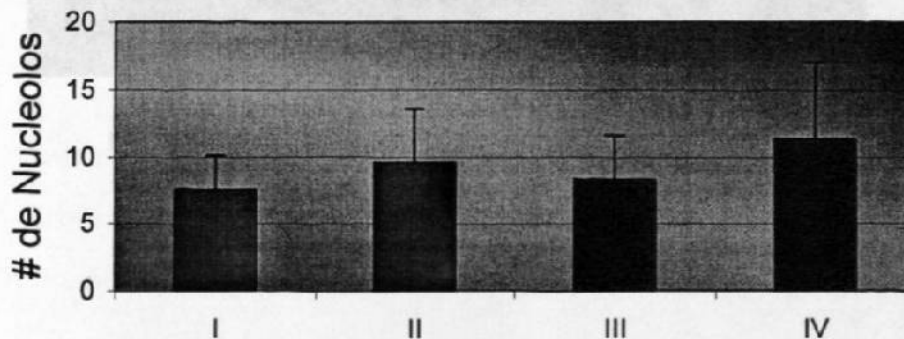
Tabla 3.25.- Presencia de zona perinuclear y vacuola por estadio gonadal.

Tabla 3.25.- Comparación del número de nucleolos por estadio gonadal.

Estadio	Grupo	Máximo	Promedio	Mínimo	Desviación estándar	Coefficiente de Variación
I	1	13	7.5806	3	2.5136	33.15832
II	2	19	9.5758	4	3.9846	41.61114
III	IV	20	8.2903	3	3.3085	39.90808
IV	3	23	11.3333	2	5.7213	50.4822

Fig. 3.22.- Presencia de zona perinuclear y vacuola en los diferentes estadios gonadales

Fig. 3.21.- Número de nucleolos por estadio gonadal.



e).- Presencia de Vacuola y Zona perinuclear

Una característica única y distintiva del estadio vitelogénico intermedio de acuerdo a la clasificación de Kulkarni *et al.* (1991), es la presencia de una vacuola en la periferia del ovocito, la cual solo se observó en ovocitos en estadio III.

Por otra parte, tanto el estadio vitelogénico intermedio como el tardío, se distinguieron por presentar una zona perinuclear, según lo reportado por Kulkarni

et al. (1991). Esta característica se presentaron en ovocitos pertenecientes a todos los estadios, siendo más frecuentes en los estadios III y IV (Tabla 3.26 y Figs. 3.22, 3.23 y 3.24).

Tabla 3.26.- Presencia de zona perinuclear y vacuola por estadio gonadal.

Estadio	Zona Perinuclear	Vacuola	Zona perinuclear y vacuola a la vez
I	Presente	Ausente	Ausente
II	Presente	Ausente	Ausente
III	Presente	Presente	Presente
IV	Presente	Ausente	Ausente

Fig. 3.22.- Presencia de zona perinuclear y vacuola en los diferentes estadios gonadales.

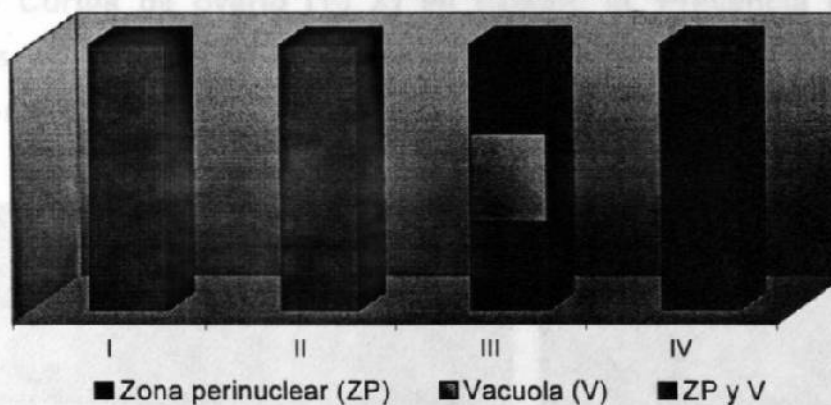


Fig. 3.24 - a) Corte de ovario en estadio III (10 X, Acido Periódico-reacción de Schiff); b) Ampliación de la zona perinuclear (Zp) (40 X), (Acido Periódico-reacción de Schiff). Barra de calibración = 52.8402.

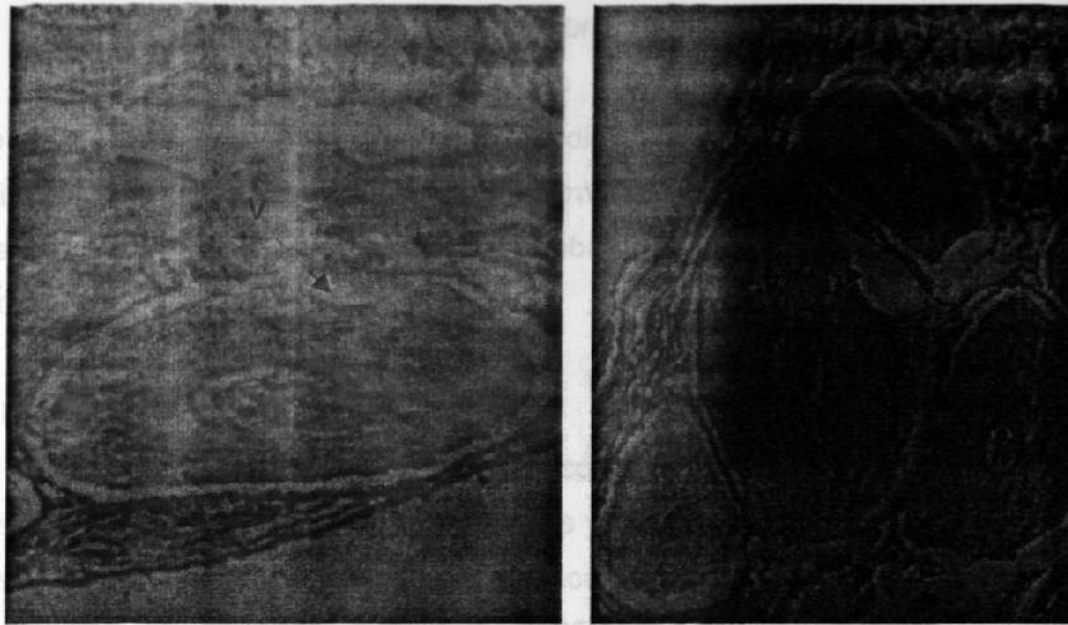


Fig. 3.23- Cortes de ovario (10 X) en estadio III. Presencia de vacuolas, distintivas de este estadio (Hematoxilina de Harris y Eosina). Barra de calibración = 52.6402.

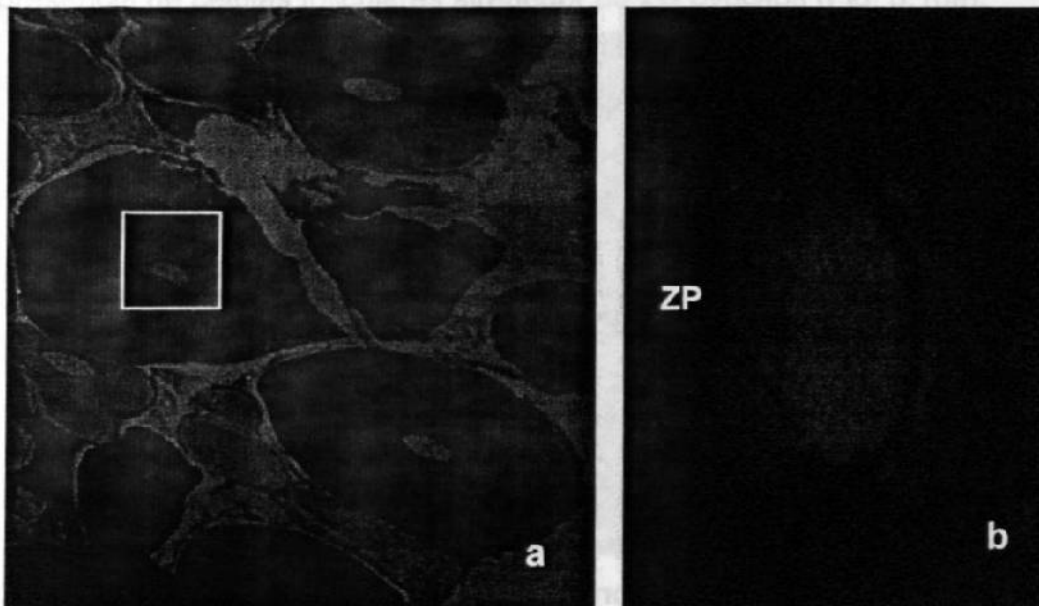


Fig. 3.24.- a) Corte de ovario en estadio III (10 X, Acido Periódico-reacción de Schiff); b) Ampliación de la zona perinuclear (Zp) (40 X), (Acido Periódico-Reacción de Schiff). Barra de calibración = 52.6402.

Cabe mencionar que en un mismo corte histológico se presentaron ovocitos de diferentes diámetros que representan diferentes estadios gonadales, esto explica el hecho de que en ovarios de estadio I y II se encuentre presente la zona perinuclear en algunas células, pero en menor proporción comparado con los estadios III y IV, lo cual viene a corroborar la continuidad del proceso de maduración.

f).- Espacios citoplasmáticos

Una característica que se observó comúnmente en los cortes de ovocitos en estadio IV fue la presencia de pequeños y numerosos espacios, que indicaban la reabsorción del ovocito. Esta característica también se presentó en ovocitos de estadio III, pero en menor cantidad (Fig. 3.25).

g).- Células foliculares

En los estadios del II al IV se presentó otra característica que corresponde a la presencia de células foliculares alrededor de los ovocitos (Fig. 3.16a).

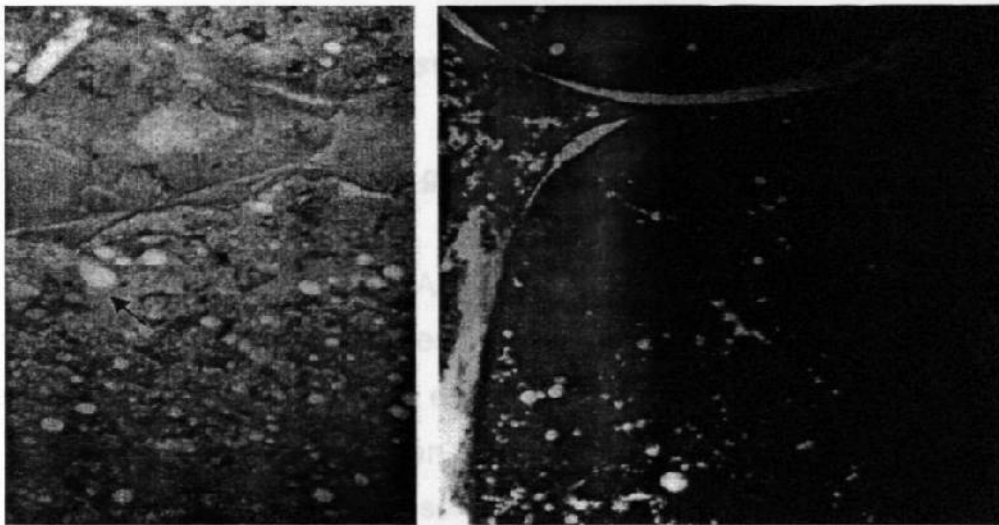


Fig. 3.25.- Corte de ovario en estadio IV donde se pueden observar una gran cantidad de espacios. a) 40X; b) 10X (Acido Periódico-Reacción de Schiff).

Todas las características morfológicas anteriormente mencionadas se presentan de manera comparativa en la Tabla 3.27.

Tabla 3.27.- Comparación de las principales características histológicas de los ovocitos por estadio gonadal.

CARÁCTER	Estadio I	Estadio II	Estadio III	Estadio IV
Diámetro del ovocito (X)	170.9149	324.1359	394.8017	760.6388
Diámetro del núcleo (X)	53.4805	68.5698	50.98841	74.53783
# de nucleolos	7.5806	9.5758	8.2903	11.3333
Forma del Ovocito	Semiesférico u ovoide	Semiesférico, ovoide, cuadrado y rectangular	Semiesférico, ovoide y cuadrado	Semiesférico, ovoide y rectangular
Presencia de Vacuola	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
Presencia de zona perinuclear	Presente	Presente	Presente	Presente
Zona perinuclear y vacuola	Ausente	Ausente	Presente	Ausente

3.3.11.- Características histoquímicas de los ovocitos.

3.3.11.1.- Observación de glicoproteínas

Utilizando la técnica de Acido periódico-Reacción de Schiff (PAS) se observaron resultados positivos desde el primer estadio gonadal, lo cual indica la presencia de glicoproteínas desde esta primera fase.

En la Fig. 3.26, se observan las reacciones positivas de los ovocitos para esta técnica, considerando la presencia de los gránulos de glicoproteínas en el citoplasma del ovocito, las cuales se tiñeron de un color morado claro a intenso dependiendo del estadio gonadal.

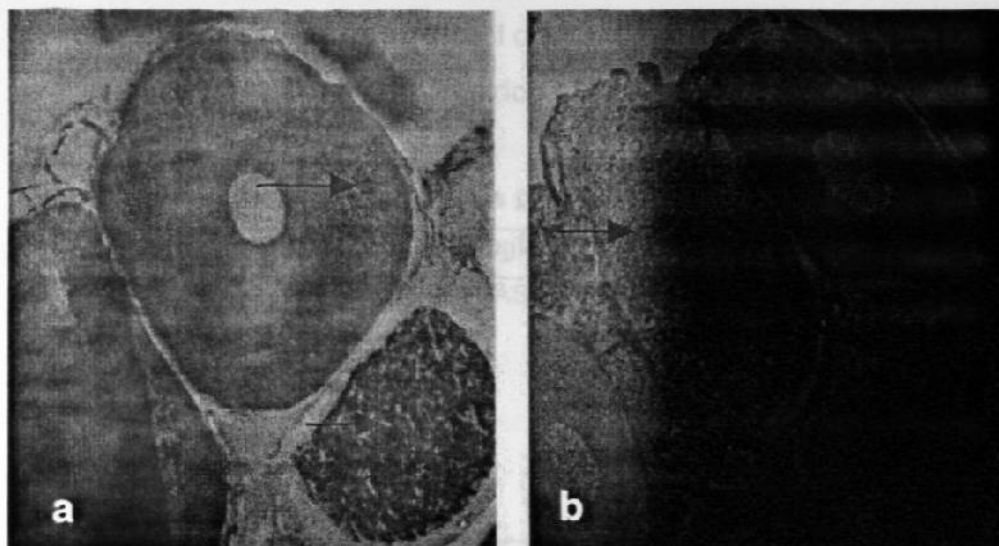


Fig. 3.26.- Cortes de ovario (10 X) con reacción positiva al Acido Periódico-Reacción de Schiff. Gránulos de glicoproteínas indicados por flechas; a) Estadío III, Barra de calibración = 52.6402; b) Estadío IV, Barra de calibración = 60.8511; (Acido Periódico- Reacción de Schiff).

3.3.11.2.- Observación de lípidos

Mediante el uso de la técnica de Black Sudan B, se observó a diferencia de la técnica de PAS, que solamente los estadíos III y IV presentaron una reacción positiva, ya que se observaron gránulos de vitelo teñidos de color azul intenso hasta negro. Para los estadíos I y II la reacción fue negativa por lo que no se observó ningún gránulo teñido. De aquí que esta técnica podría considerarse como la más adecuada para indicar el inicio de la vitelogénesis.

Cabe mencionar que las reacciones de esta tinción, solo se pueden observar por poco tiempo, ya que con la exposición a la luz desaparece la coloración producida en los lípidos.

3.3.11.3.- Comparación de las técnicas de PAS y BSB

Los resultados positivos para ambas técnicas de tinción por separado, no indican con exactitud la presencia de la lipo-glico-carotenoproteína. Por esta razón se utilizaron ambas técnicas para determinar en que fase de desarrollo gonadal se

inicia el proceso de vitelogénesis, lo cual ocurrió en los estadios III y IV, en la tabla 3.28, se presentan los resultados obtenidos para las dos técnicas.

Tabla 3.28.- Reacciones histoquímicas para cada estadio gonadal.

Estadio	Técnica Histológica	Técnica histológica
	Reacción de PAS	Reacción de BSB
I	Negativo	Negativo
II	Positivo	Negativo
III	Positivo	Positivo
IV	Positivo	Positivo

3.4.- DISCUSION

3.4.1.- Caracterización de las gónadas

En los crustáceos decápodos, el ovario de las hembras durante su desarrollo presenta cambios en talla y color (Aiken y Waddy, 1980), además de su composición bioquímica (Suko, 1953; Charniux-Cotton, 1985; Yano y Chinzei, 1987; Yano, 1988, Browdy *et al.*, 1990; Spaargaren y Haefner, 1994). Estas características distintivas de las gónadas, han permitido establecer diversas clasificaciones del ovario en diferentes grupos de crustáceos (Woo-Koo, 1988), como en especies de camarones (Bomirski y Klek, 1974; Crocos y Kerr, 1983; Yano, 1988; Quackenbush, 1989; Quinitio *et al.*, 1990; Haefner y Spaargaren, 1993; Medina *et al.*, 1996; Sandoval-Quintero y Gracia, 1998), cangrejos ermitaños (Varadarajan y Subramoniam, 1980), cangrejos braquiuros (Meredith, 1952; Lee y Puppione, 1988; Quackenbush y Keeley, 1988; Lee y Watson, 1995), langostinos (Bomirski y Klek, 1974; Tsumura y Nakagawa, 1989; Spaargaren y Haefner, 1994; Lee y Chang, 1997), acociles (Suko, 1953; Perryman, 1969; de la Bretonne y Avault Jr., 1976; France, 1987; Kulkarni *et al.*, 1991) y langostas (Aiken y Waddy, 1980; Talbolt, 1981; Byard y Aiken, 1984; Minagawa y Higuchi, 1997).

En este estudio se adoptó la clasificación de gónadas propuesta por de la Bretonne y Avault Jr. (1976), quienes consideran cuatro estadios de desarrollo gonadal para *Procambarus clarkii*, en base al color y al tamaño de los ovocitos. Sin embargo, encontramos algunas diferencias en los colores propuestos para cada estadio, por ejemplo, en el estadio I, las gónadas no son totalmente blancas como lo indica esta clasificación, sino que pueden adquirir una tonalidad amarilla. Para el estadio II, si coincidió con el color crema señalado, pero las mayores diferencias se observaron en los estadios III y IV, donde el color varió de marrón a diferentes tonos de café claro, hasta que el ovario adquiere un color café oscuro en el estadio IV.

Otro criterio para la clasificación de gónadas de *P. clarkii*, es el propuesto por Kulkarni *et al.* (1991), quienes consideran los aspectos histoquímicos de los ovocitos, para distinguir los diferentes estadios gonadales.

Los patrones de coloración del ovario cambian de un grupo de crustáceos a otros, y dichas variaciones están determinadas por la incorporación y concentración de vitelo exógeno al ovario (Bomirski y Klek, 1974; Croisille *et al.*, 1974; Webb, 1977; Aiken y Waddy, 1980; Lee y Puppione, 1988; Zagalski *et al.*, 1990), y en particular debido a la aparición o presencia de pigmentos carotenoides ligados a estas lipoproteínas extraovocitarias (Varadarajan y Subramoniam, 1980; Lee y Puppione, 1988; Quintio *et al.*, 1990; Chen y Chen, 1994; Alunno-Bruscia y Sainte-Marie, 1998). Estos pigmentos se concentran en el hepatopáncreas y pasan a la hemolinfa durante la vitelogénesis sirviendo como acarreadores que facilitan la entrada de las lipoproteínas al interior de los ovocitos (Varadarajan y Subramoniam, 1980); otra función de estas moléculas es proteger a las proteínas y a otras reservas alimenticias de la acción enzimática en los ovarios en desarrollo (Aiken y Waddy, 1980). En el último capítulo se presentaran con detalle las características de la VTG y VTL, pero podríamos mencionar que los pesos moleculares de la VTG y VTL fueron 521.8 y 512.6 KD, de las respectivamente. Estos elevados pesos moleculares son una consecuencia de la asociación de las proteínas con lípidos, glúcidos y grupos prostéticos carotenoides originados durante la vitelogénesis (Meusy, 1980).

Las carotenoproteínas de crustáceos dan un color al ovario que varía de naranja, azul, púrpura o verde (Zalgasky *et al.*, 1990). Adicionalmente, existen diferencias en la coloración de los ovarios según su desarrollo y madurez, así los ovarios inmaduros generalmente se caracterizan por presentar una coloración pálida, blanca o amarilla (Meredith, 1952; Ranking *et al.* 1989; Kulkarni *et al.*, 1991; Dubé y Portelance, 1992), mientras que los ovarios maduros pueden tener un color naranja (Meredith, 1952; Lee y Puppione, 1988, Nakamura, 1994), aunque pueden adquirir tonalidades de gris, verde, púrpura, y café oscuro hasta negro, depende del tipo de carotenoide que predomine en su dieta y del metabolismo del animal (Webb, 1977; Tsumura y Nakagawa, 1989; Kulkarni *et al.*, 1991; Aiken y Waddy, 1992; Dubé y Portelance, 1992). Sin embargo, Haefner y Spaargaren (1993), señalan que esta coloración puede ser un efecto de la fijación de los ovarios y a un cambio en el pH (Webb, 1977).

En acociles, como *P. clarkii* para su crecimiento y desarrollo se considera necesaria una dieta de origen vegetal, ya que esta contiene pigmentos carotenoides que dan color al tegumento y al hepatopáncreas, su carencia ocasiona un tegumento gris o azul pálido y un hepatopáncreas pequeño y con poco color (Aiken y Waddy, 1992).

3.4.2.- Muda

Los crustáceos decápodos pueden ser agrupados en tres categorías de acuerdo a la organización de los procesos de muda y crecimiento:

1).- Aquellos en los cuales la reproducción tiene lugar durante el largo período de intermuda (cangrejos, langostinos y acociles), es decir, los procesos de reproducción y crecimiento están programados como eventos antagónicos. En este caso, el período de intermuda es lo suficientemente largo para que ocurran uno o dos ciclos reproductivos, y los animales entran a un periodo corto de premuda solamente después de la oviposición y liberación de crías. 2).- Aquellos en los cuales el crecimiento gonadal y somático se manifiesta simultáneamente "sinergista" (isópodos y algunos camarones Natantia). En este caso, la intermuda es demasiado corta para que se lleve a cabo un ciclo ovárico y la premuda es larga. 3).- En otros decápodos, hay una ocurrencia rápida de la muda y la reproducción, por lo que se puede requerir algunos ciclos de muda, como en los cirripedios (Adiyodi y Subramoniam, 1983; Crocos y Kerr, 1983; Charniux-Cotton, 1985 y Quackenbush, 1986).

Como las interrelaciones de muda y reproducción varían de una especie a otra, el ciclo de muda debe ser considerado en cualquier estudio de reproducción. El efecto antagonista de muda y crecimiento, se observó en *Uca pugilator*, donde la frecuencia máxima de los procesos de muda coincide con el peso mínimo del ovario y viceversa (Webb, 1977). Otros estudios al respecto, fueron hechos con las especies *Palaemon paucidens*, *Macrobrachium rosenbregii*, *Palinurus argus* y *Procambarus clarkii*, donde se comprobó una interacción antagónica entre la muda y crecimiento del ovario (Quackenbush y Herrnkind, 1981; O'Donovan *et al.*, 1984; Tsumura y Nakagawa, 1989; Daniels *et al.*, 1994).

En este estudio se determinó que el 79.76% de las hembras se encontraron en el estado C (intermuda). De las 56 (19.24%) hembras en estado D (premuda), el 89.28% presentaron gónadas de los primeros estadios de desarrollo gonadal. Con estos resultados obtenidos se constata que el proceso de muda y crecimiento gonadal en esta especie de acocil son procesos antagónicos, tal como lo señalan Daniels *et al.* (1994), quienes observaron que las hembras no mudan una vez que hay un notable crecimiento ovárico (Vitelógenesis), y solamente mudan después del desove y cuando los juveniles son liberados de la madre. Del total de hembras recolectadas (291), se determinó que únicamente tres especímenes estuvieron en el estado de postmuda (recién mudados) y sus ovarios correspondían a los estadios I y II. En relación con esto, Tobías-Chavana (1991), menciona que en las hembras de *P. clarkii* que fueron epedunculadas se aceleró el desarrollo gonadal en especímenes que no mudaron y la presencia de muda tuvo un efecto negativo sobre el peso de la gónada y los IGS.

3.4.3.- Datos morfométricos

Los ejemplares utilizados en este estudio presentaron un incremento en los valores promedio de longitud del cefalotórax (LC) y peso total(PT), de un estadio de desarrollo gonadal a otro, pero de acuerdo a la prueba de Duncan (comparación de medias), solo se presentaron diferencias significativas entre la talla y peso de las hembras en estado I y III, y no así entre los estadios II y III. No obstante, que los promedios aumentaron en razón del estadio gonadal, se observó un traslape en las tallas y/o pesos entre los diferentes estadios de maduración gonadal.

Las hembras utilizadas presentaron distintas tallas, con un rango de 12 a 48.50 mm de LC, y lo que permitió la obtención tanto de ovarios maduros como inmaduros. En el género *Procambarus* la talla de madurez depende de factores ambientales (e.g. temperatura) y varía de 45 a 125 mm de LT (estos valores corresponden a 22.5 y 62.5 mm de LC) (Huner, 1988; Aiken y Waddy, 1992). En *Procambarus clarkii*, el crecimiento depende estrechamente del tipo de hábitat, así, en estanques temporales y reservorios la talla de madurez es de 57 a 76 mm

de LT (28 a 38 mm LC), mientras que en pantanos se registran tallas entre los 88 a 107 mm de LT (44 a 53 mm LC) (Huner y Barr, 1984). Por otra parte, Huner (1990), menciona que la talla de madurez en acociles está en función de las especies, potencial de crecimiento genético y condiciones ambientales, y esta talla oscila entre los 50-60 mm de LT (25 a 30 mm LC). En contraste, Somer (1984), menciona que hembras grávidas de *Procambarus clarkii* presentaron tallas de 36 a 56 mm de LC. Este último rango involucra sólo la LC, que representa casi la mitad de la LT, por lo que estas tallas equivalen a 72 y 112 mm de LT, lo que coincide con el rango en el que se produce la madurez sexual. De igual manera, la talla de las hembras utilizadas en el presente estudio permitió contar con especímenes con ovarios maduros. Kulkarni *et al.* (1991), utilizando hembras de 19-48 mm de LC, encontraron todas las fases de desarrollo ovárico, desde el estado oogonial hasta el vitelogénico.

Las tallas de las hembras recolectadas difieren a las tallas observadas por Rodríguez-Almaraz (1992), quien recolectó hembras y machos en el mismo sitio, con una talla de 24 a 52 mm de LC. Esta posible variación puede atribuirse a los cambios ecológicos en el área de estudio, como la reducción del nivel de agua, sequía y una carencia de fuentes alimenticias, principalmente de origen vegetal, tal como señalan Avault Jr. *et al.* (1974) y Cauge *et al.* (1982), quienes adicionalmente indican que la reducción o ausencia de vegetación provoca que el crecimiento se detenga en tallas subcomerciales de menos de 75 mm de LT (37.5 mm de LC).

En machos de *P. clarkii*, la talla de madurez puede alcanzar valores de hasta 115 mm de LT (Huner y Romaine, 1978). Los machos son más pesados que las hembras, esto se debe al desarrollo acelerado de las quelas, mientras que las quelas de las hembras permanecen isométricas con su LT (Romaine *et al.*, 1976). Además, los machos son más grandes que las hembras de la misma edad, ya que estas al presentar huevos adheridos, suprimen el proceso de muda (Aiken y Waddy, 1992). Esta relación tiene lugar en la mayoría de los crustáceos decápodos, considerando que gran parte de la energía está dirigida hacia el

crecimiento ovárico, por esta razón la tasa de crecimiento de los machos maduros es más rápida que en las hembras maduras (Aiken y Waddy, 1992).

Al respecto, Chien y Avault, Jr. (1980), mencionan que la tasa de crecimiento de *P. clarkii* está relacionada con una mayor disponibilidad de alimento.

3.4.4.- Peso ovarico

En los crustáceos decápodos, como en la langosta *Homarus americanus*, el desarrollo ovárico se manifiesta externamente por cambios en color y talla (e. g. peso del ovario) (Aiken y Waddy, 1980). El peso del ovario como un indicador del estado gonadal en crustáceos decápodos, se ha utilizado con *Procambarus simulans* (Perryman, 1969), *Uca pugilator*, (Quackenbush y Keeley, 1988) y *Crangon crangon* (Spaargaren y Haefner, 1998). En el presente estudio se observó que el peso promedio del ovario fue incrementándose en relación con el estado gonadal, pero no existieron diferencias significativas entre los pesos promedio de los estadios I y II, por otra parte, los estadios III y IV fueron significativamente diferentes entre sí y además de estos dos últimos estadios, con respecto al subconjunto formado por los estadios I y II. Los valores del peso ovárico promedio desde el estadio I al IV fueron de 0.0262 a 0.4695 g, desde el estadio I al IV, respectivamente. Sin embargo, los valores mínimos y máximos obtenidos fueron 0.0043 (estadio I) y 1.4819 g (estadio IV); además hubo traslape en los pesos de un estadio a otro, esto se puede relacionar a las diferentes clases de talla (LC) de las hembras en cada estadio. Por ejemplo, se obtuvieron hembras con tallas de 20 mm de LC (equivale casi a 40 mm de LT) que presentaron ovarios vitelogénicos, lo cual no corresponde a la talla de madurez registrada para esta especie que oscila entre los 50 - 60 mm de LC (Huner, 1990).

Esta variación en el rango de la talla de madurez sexual, podría estar relacionado a los cambios del hábitat o fluctuaciones ecológicas observadas en el sitio de colecta, principalmente por la falta de lluvias y el poco aporte de agua, que provocó que las hembras maduraran a tallas menores. Est coincide, a las observaciones hechas por Aiken y Waddy (1982), Huner (1988) y Huner (1990),

quienes relacionaron que los acociles maduran a tallas subcomerciales como un efecto del cambio de hábitat. Por otra parte, cabe destacar que se capturaron hembras con la misma talla pero que presentaron diferente estadio gonadal, este aspecto ha sido igualmente reportado por Chu (1995) en *Penaeus joyneri*, donde el peso del ovario se incrementó con la LC, pero las hembras maduras fueron más pesadas que las hembras inmaduras de la misma talla. Haefner y Spaaragaren (1993), mencionan que el peso del ovario en *Crangon crangon*, se incrementó hasta la vitelogénesis, tal como ocurrió en el presente estudio. Estos mismos autores mencionan que el peso ovárico y el estado de desarrollo gonadal, tienen una relación exponencial y además el incremento del peso ovárico está más relacionado al aumento en volumen del ovario que el incremento del el número de ovocitos.

El peso promedio mensual fue mayor en los meses de Enero (0.4864 ± 5457) y Diciembre (0.3577 ± 0.4588), pero los pesos máximos fueron observados a partir de Julio que es la época postcopulatoria de esta especie (Huner y Barr, 1984). Esto coincide con la estacionalidad reproductiva de *P. clarkii* en estanques de Louisiana y Mississippi, donde los "picos" de desove ocurren de finales de verano hasta mediados de otoño (Huner, 1975; Dendy, 1978; Huner *et al.*, 1994). Sin embargo, se pueden localizar hembras grávidas en cualquier época del año (Huner, 1975; Huner y Avault, 1976b), por lo tanto, hay un reclutamiento continuo (Daniels *et al.*, 1994).

Kulkarni *et al.* (1992), mencionan que Enero es el inicio del período anual de crecimiento ovárico y de maduración de *P. clarkii*, presentando tres fases en este ciclo de reproducción, 1) Crecimiento y maduración (Enero a Marzo), 2) Enmadrigamiento (desove, Junio a Septiembre) y 3) Eclosión (Octubre a Diciembre).

3.4.5.- Indices Gonadales

3.4.5.1 Indices Gonadosomáticos (IGS)

Una variedad de Índices Gonadosomáticos (IGS) han sido usados para caracterizar los ciclos reproductivos de diversos invertebrados (Gonor, 1972; Grant y Tyler, 1983), ya que describen la actividad gonadal (De Vlaming *et al.*, 1982) y son los indicadores más simples del estado reproductivo (Grant y Tyler, 1983). En los crustáceos decápodos, los IGS también han sido usados en diferentes estudios de reproducción, como una medida de la madurez gonadal (Quackenbush y Herrnkind, 1981; Yano y Chinzei, 1987), incluso se han definido los valores porcentuales de los IGS que deben tener las hembras vitelogénicas en diferentes especies de crustáceos (Armitage *et al.*, 1972; Yano y Chinzei, 1987; Kulkarni *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1993; Chang y Jeng, 1995).

Haefner y Spaargaren (1993), observaron que el peso húmedo del ovario del camarón *Crangon crangon*, se incrementó gradualmente hasta la previtelogénesis, pero el desarrollo fue significativamente más rápido en la vitelogénesis secundaria hasta en un 282%. Las hembras de *Procambarus clarkii*, utilizadas en este estudio, presentaron valores promedio de IGS que se incrementaron a medida que avanzó la madurez gonadal desde 0.2878 (estadio I) hasta 3.5564 (estadio IV), sin embargo, el rango de los valores absolutos fue de 0.0775 (estadio I) a 9.7923 (estadio IV). En estudios previos, los IGS obtenidos en esta especie registraron valores inferiores, comparados a los obtenidos en este estudio. Daniels *et al.* (1994), determinaron un rango de IGS de 0.063 a 1.223%, que estuvo en función a los diferentes tratamientos de temperatura y fotoperíodo a los que fueron expuestas las hembras; mientras que Kulkarni *et al.* (1991), registraron un valor de 0.006 para ovarios inmaduros y 2.622 para ovarios vitelogénicos tardíos, puntualizando que el estadio postvitelogénico y reabsortivo de la gónada, el IGS respectivo disminuyó notablemente, obteniendo un valor de 0.021%.

Estas posibles diferencias en los valores de IGS se pueden atribuir a que el estudio de Daniels *et al.* (1994), fue hecho en condiciones de laboratorio y los

valores de IGS no corresponderían por lo tanto a hembras silvestres como en nuestro caso. Por otra parte, la investigación realizada por Kulkarni *et al.* (1991), no menciona el número total de hembras utilizadas y tampoco el período del año en que fueron capturadas, ambos factores podrían influir en la determinación de los IGS. Según Kulkarni *et al.* (1992), esta especie en Lousiana, presenta un ciclo de crecimiento ovárico y de maduración bien definido Sin embargo, *P. clarkii* puede reproducirse durante todo el año (Huner y Barr, 1984; Daniels *et al.*, 1994). Además, el rango de la talla de las hembras recolectadas por nosotros (12 - 48.50 mm de LC), es muy similar a la talla de las hembras usadas en el estudio de Kulkarni *et al.* (1991), que fue de 19 - 44 mm de LC, por lo tanto, podría esperarse que los índices reproductivos fueran similares. Sin embargo, la talla de madurez que alcanza esta especie se relaciona con el tipo de hábitat y alimentación (Huner, 1978a; Huner y Barr, 1984; Aiken y Waddy, 1992). Además, las hembras de ambos estudios pertenecen a diferentes poblaciones, por lo tanto, las características ecológicas son particulares para cada uno de las poblaciones

En otros estudios de reproducción de crustáceos, utilizan un índice gonadal que no relaciona el peso del ovario con el peso corporal, sino que la talla (LT o LC), es la variable de referencia (Aiken y Waddy, 1980; Courtney *et al.* 1995; Minagawa y Higuchi, 1997; Tsuchida y Watanabe, 1997).

De acuerdo a De Vlaming *et al.* (1982), una consideración básica para el uso de IGS, entre otras, es que la relación del peso gonadal con el peso corporal sea lineal y que esta relación permanezca igual en todas las fases de desarrollo. Por otra parte, es necesario observar las variaciones del peso corporal de hembras de la misma talla. Al respecto, Bomirski y Klek, (1974) mencionan que al menos en *Rithopanopenaeus harrisci*, estos índices no son confiables, ya que el peso corporal de las hembras está influenciado por la dureza del caparazón y tamaño de la quela. En el caso particular de *P. clarkii*, como se mencionó anteriormente, se ha observado diferencias en el crecimiento alométrico de las quelas de ambos sexos, (Romaine *et al.*, 1976).

Considerando que el peso de las quelas de las hembras puede representar un porcentaje significativo del peso total, en este estudio, se trató de recolectar

sólo hembras completas para minimizar un posible error en la elaboración de los IGS, sin embargo, en algunos meses de muestreo se observó una baja densidad de la población, principalmente después de una lluvia, y se recurrió a recolectar todas las hembras disponibles, incluyendo algunas de que carecían de quelas o bien, estos apéndices estaban poco desarrollados. Debido a lo anterior, se realizó un análisis de regresión lineal de peso gonadal con peso corporal determinando que esta relación fue positiva, y la carencia de quelas en algunas hembras no tuvo un efecto significativo en la asociación de ambas variables.

Hasta el momento, no existen datos en la literatura que permitan comparar los valores de IGS por mes sin considerar el estado gonadal, a excepción del realizado por González-Aguilar (1995), quien menciona que para esta especie (*Procambarus clarkii*), también recolectada en el mismo sitio, el mayor IGS promedio se presentó en Agosto (3.099) y el menor en Junio (0.2111). En el presente estudio, también el máximo valor de IGS mensual promedio correspondió al mes de Agosto (2.9204), pero el menor valor se encontró en Octubre (1.0156), estos resultados coinciden con los atributos de esta especie en Lousiana, donde se establece que a finales de Octubre y principios de Noviembre hay mayor cantidad de hembras ovígeras, además se presenta un segundo grupo de hembras postovígeras a principios de Enero, pero el desove se presenta en una menor cantidad de hembras (Avault Jr., 1972; de la Bretonne y Avault, 1976; Dendy, 1978; Romaine y Lutz, 1989).

El menor y mayor valor de la desviación típica del IGS mensuales fueron 0.3850 (Junio) y 3.0662 (Enero), respectivamente. Sin embargo, los coeficientes de variación (CV), indican que hay una mayor dispersión de nuestros IGS, para el mes de Marzo (CV = 206.8452). Esto se puede atribuir a la presencia de hembras de diferente clase de edad, esto es, la existencia de hembras postovígeras y nuevas reclutas, considerando que esta especie tiene un reclutamiento continuo, como se indicó anteriormente (De la Bretonne y Avault Jr., 1976; Huner, 1978a y b; Dendy, 1978; Romaine y Lutz, 1989) y esta mezcla de hembras de distinta edad puede influir en la condición gonadal de las mismas (maduras e inmaduras).

3.4.5.2- Índice Gonadal Relativo (IGR)

Este índice ha sido poco utilizado para evaluar la condición reproductiva de organismos acuáticos, una característica importante del IGR, es que para su construcción se elimina del peso total de las hembras, el peso de la gónada (Erickson *et al.* , 1985). La utilización de este índice en este estudio se debe a que las pendientes de regresión de la ecuación $W=aS^b$, no presentaron diferencias significativas, lo cual es un requisito básico para su uso. Adicionalmente, el IGR permitió comparar los resultados del IGS. En ambos índices, los valores promedio del estadio IV presentaron diferencias significativas con los tres primeros estadios, esto se explica por el incremento significativo de la biomasa gonadal. El cálculo del IGR implica un mayor esfuerzo estadístico a diferencia del IGS, que es un índice más convencional por la simplicidad de su obtención.

3.4.6.- Peso de el hepatopáncreas (PH)

Los pesos promedio del pH agrupados por estadio gonadal, se incrementaron del estadio I al III, pero decreció ligeramente en el estadio IV, esta apreciación coincide a los resultados obtenidos del peso de hepatopáncreas por Daniels *et al.* (1994) y Armitage *et al.* (1972), ambos señalan que este estadio corresponde a la fase vitelogenica del ovario, donde hay una disminución del peso de este órgano debido al transporte de la energía necesaria hacia los ovocitos vitelogenicos. Incluso en esta fase tanto el ovario y el hepatopáncreas pueden tener la misma talla (Amaro-Pinheiro y Fransozo, 1998), pero en nuestros resultados el hepatopáncreas durante este estadio fue más pesado, con un 31% más de biomasa que el ovario. Haefner y Spaargaren (1993), mencionan que los cambios en volumen de ambos órganos en el camarón *Crangon crangon*, deben ser asociado con el transporte de reservas del hepatopáncreas, absorción y síntesis por el ovario, y hay un notorio decremento del hepatopáncreas durante la vitelogénesis. A pesar del decremento del valor promedio del pH observado entre el estadio III y IV, no se presentaron diferencias significativas entre ambos promedios, esto podría relacionarse a que los ovocitos del estadio III ya son

vitelogenicos, como se comprobó por histoquímica y bioquímica durante este estudio.

Los valores promedio del pH mensual, al no ser agrupados por estadio gonadal, no reflejan la actividad cíclica gonadal de esta especie, tomando en cuenta que el acocil rojo puede reproducirse todo el año, por lo que estos promedios son el producto de una mezcla de hembras en distinto estado de desarrollo ovárico y de diferente talla (20-48 mm de LC), que incluye hembras maduras e inmaduras. Armitage *et al.* (1972), encontraron que el pH de las hembras grandes y maduras (>35 mm de LC) del acocil *Orconectes nais*, se incrementó al doble de Abril a Mayo, y empezó a decrecer en el verano y en Octubre se obtuvo valores muy bajos, similares a los de Abril. Mientras que las hembras pequeñas (20-30 mm LC), los valores de PH en peso húmedo cambiaron ligeramente de un mes a otro.

3.4.7. Indices Hepatosomáticos (IHS)

Los valores del IHS obtenidos en este estudio presentaron un rango diferente (2.0448-11.8644), al citado para esta misma especie por Daniels *et al.* (1994), quienes establecieron un rango de IHS de 6.78 a 8.99 en hembras maduras, aunque este estudio fue hecho en laboratorio. Por otra parte, Los IHS promedio del estadio III presentaron un incremento significativo, con respecto a los primeros estadios y fue significativamente diferente al valor promedio del estadio IV.

En las especies como *Penaeus kerathurus* y *Procambarus clarkii*, los valores respectivos del IHS permanecen constantes y no presentan diferencias significativas entre un estadio gonadal y otro (Mourente y Rodriguez, 1991; Daniels *et al.*, 1994). Por otra parte, en el camarón *Metapenaeus joyneri*, Chu (1995), determinó que los IHS de los primeros estadios son similares, para incrementarse en los últimos estadios. Esto coincide a las observaciones hechas por Lee y Chang (1997), con el langostino *Macrobrachium rosenbergii*, quienes encontraron resultados similares del IHS, donde los IHS se incrementan de 4.49 a 6.17 del estadio I al II, pero decrecen a partir del estadio III (4.37) hasta alcanzar

un valor de 3.58 en el estadio IV. Ellos consideraron que el decremento del IHS en este estadio es debido a la movilización de lípidos de reserva del hepatopáncreas hacia los ovocitos en maduración, esta conclusión también pudo ser la razón de los cambios observados en los IHS por estadio gonadal en la especie de referencia de este estudio.

Los IHS por mes presentó valores constantes de Febrero a Julio, pero decrecieron de Agosto a Octubre, para incrementarse en Noviembre y Diciembre , y nuevamente presentaron valores inferiores en Enero. El decremento observado entre Agosto y Octubre, se relacionó con el principal período de desove de *Procambarus clarkii* en hábitats de Louisiana (Huner y Barr, 1984) y el área central de Nuevo León (Abdo de la Parra, 1991; González-Agular, 1995).

3.4.8.- Relación del IGS e IHS

No obstante que el análisis de regresión entre los valores de IGS e IHS(sin considerar el estadio gonadal) determinó que no hay una relación significativa. Se observó un decremento del IHS durante la época reproductiva (Agosto-Octubre) de esta especie y coincide con el máximo valor del IGS observado a lo largo del muestreo.

Los IHS por estadio gonadal fue mayor a los IGS, aunque hubo un ligero decremento del IHS entre el estadio III y IV. Esto coincide, con los resultados de IHS obtenidos por Daniels *et al.* (1994), para hembras de esta misma especie, quienes fueron expuestas a diferentes valores de temperatura y fotoperíodo en condiciones de laboratorio.

En el langostino *Macrobrachium rosenbergii*, el IGS solamente fue mayor al IHS en el último estadio (V) (Lee y Chang, 1997). Por otra parte, en los camarones *Metapenaeus joyneri* y *Penaeus kerathurus*, los IGS presentaron valores más altos que los IHS en los dos últimos estadios (III y IV) (Mourente y Rodríguez, 1991; Chu, 1995).

3.4.9.- Histología gonadal

En este estudio se utilizaron tres técnicas histológicas, las cuales permitieron caracterizar de manera morfológica y química a los ovocitos en los diferentes estadios de desarrollo. Estas fueron la técnica de Hematoxilina de Harris y Eosina, Ácido Periódico-Reacción de Schiff y Black Sudan B.

La técnica de Hematoxilina de Harris y Eosina (H y E) ha sido utilizada en diferentes estudios del desarrollo gonadal de crustáceos decápodos con el propósito de observar la morfología y características celulares (O'donovan *et al.*, 1984; Paulus y Laufer, 1987; Crocos y Kerr, 1983; Minagawa y Higuchi, 1987; Yano y Chinzei, 1987; Sandoval - Quintero y Gracia, 1998). Esta técnica histológica también ha sido usada con el mismo fin en *P. clarkii* por Nagamine y Knigh (1987); Kulkarni *et al.* (1991), Kulkarni *et al.* (1992) y Sarojini *et al.* (1995).

3.4.9.1.- Células foliculares (CF)

En todos los estadios gonadales fue observado células foliculares, pero en el estadio I, estas fueron encontradas de manera dispersa en la matriz ovárica; para los estadios II, III y IV. Las CF estuvieron presentes alrededor de los ovocitos, sin embargo, estas células fueron más grandes para el estadio II. Esto coincide con las observaciones hechas por Kulkarni *et al.* (1991) y Tobias-Chavana (1991).

3.4.9.2.- Diámetro de ovocitos

Los ovocitos presentaron un rango de diámetro entre 22.1689 y 1285.7950 μm a través de todos los estadios de desarrollo gonadal, este rango difirió al registrado por Kulkarni *et al.* (1991), para esta misma especie, quienes establecieron un rango de 10 a 980 μm . Esta diferencia se puede relacionar con los máximos valores de IGS de ambos trabajos, y que en este estudio correspondió a 3.5565, mientras que el registrado por Kulkarni *et al.* (1991) fue de 2.622, esto indica que las gónadas de las hembras de este estudio fueron más pesadas. Por su parte, Spaargaren y Haefner (1998), señalan al respecto que el incremento del peso ovárico esta más relacionado al incremento en volumen que

al aumento del número de ovocitos, particularmente en los últimos estadios. Por lo tanto, en este caso el mayor peso gonadal sería atribuible a un notable aumento del diámetro de los ovocitos durante su desarrollo. Este crecimiento de los ovocitos se relaciona con la toma activa de vitelo extraovárico (Charniux-Cotton, 1978; Fauvel, 1986) y la síntesis de vitelina (Fielder *et al.*, 1971; Shafir *et al.*, 1992).

Es importante señalar que para cada estadio de desarrollo solamente fueron medidos los ovocitos mayores y con núcleos, ya que en un mismo corte fue observado diferentes grupos de ovocitos, tanto en tamaño como en forma. Al respecto, Tom *et al.* (1987), Damrongphol *et al.*, (1991), Kulkarni *et al.* (1991) y Medina *et al.* (1996), mencionan que en un ovario, aún maduro, se pueden observar diferentes clases de talla de ovocitos que corresponden a diferentes estadios de desarrollo.

3.4.9.3.- Diámetro de los núcleos

El núcleo presentó un incremento en su diámetro de un estadio a otro, exceptuando la transición del estadio II al III, donde su valor promedio fue inferior al estadios II y IV, sin embargo, en cada estadio gonadal la relación núcleo/citoplasma siempre fue mayor al pasar de un estado de madurez a otro más avanzado, desde 1:3 hasta 1:10. Esta misma relación de decremento del núcleo de un estadio a otro, también fue observada por Kulkarni *et al.* (1991), ya que en el estadio V (vitelogénico intermedio), el diámetro disminuyó con respecto a los estadios IV (Vitelogénico temprano) y VI (Vitelogénico tardío). Considerando esta característica morfométrica de reducción del núcleo, las hembras del estadio III de nuestro estudio, correspondieron a un estado vitelogénico.

En los primeros estadios observamos que la posición del núcleo fue central en el ovocito, tal como lo señala Kulkarni *et al.* (1991), en su clasificación establecen que en los primeros cinco estadios, los núcleos son de posición central y que a partir de la fase vitelogénica tardía, como ocurrió en nuestro estudio, el núcleo puede tener una posición periférica. Al respecto, Yano (1988), observó que los ovocitos maduros de *Penaeus japonicus* presentan núcleos que emigran a la

periferia del citoplasma. Al final de un ciclo vitelogénico (postvitelogénico y reabsortivo) de *P. clarkii*, los núcleos son deformes (Kulkarni *et al.*, 1991).

3.4.9.4.- Forma de los ovocitos

Se observó que la forma de los ovocitos fue variable de acuerdo al estadio gonadal. Así en los primeros estadios (I y II) fueron semiesféricos u ovoides y en los últimos (III y IV), presentaron una forma rectangular. A esta misma conclusión llegaron Kulkarni *et al.* (1991), quienes observaron una forma cuadrangular del ovocito en la fase de vitelogénesis tardía (estadio III). A este respecto, Minagawa y Higuchi (1997), mencionan que en las langostas palinuridas, la forma de los ovocitos se puede utilizar como un índice de maduración del ovario.

3.4.9.5.- Número de nucleolos

Existió una variación del número de nucleolos por estadio, con un rango de 2 a 23, este último valor correspondió al estadio IV. Estos valores obtenidos difieren considerablemente a lo registrado para esta misma especie por Kulkarni *et al.* (1991), quienes encontraron hasta 4 y raramente más nucleolos en la fase vitelogénica intermedia. Esta variación y gran cantidad de número de nucleolos en nuestras hembras, particularmente las de estadio IV, esta presente de manera similar en *Parapenaeus longirostris*, donde estos organelos en la fase vitelogénica son transformados en numerosas estructuras pequeñas que rodean al núcleo y en la terminación de esta fase, los nucleolos desaparecen (Tom *et al.*, 1987b).

3.4.9.6.- Presencia de vacuola y zona perinuclear

Los ovocitos del estadio III presentaron una característica distintiva de la etapa vitelogénica intermedia de la clasificación propuesta por Kulkarni *et al.* (1991), que fue la presencia de una cavidad a manera de vacuola. Sin embargo, es importante señalar que los ovocitos de algunos ovarios de este estadio, no presentaron esta cavidad, por lo tanto, esta fase de desarrollo incluye el estado vitelogénico inicial e intermedio de la clasificación mencionada. Además, hay otras características que permitieron comparar ambas clasificaciones y determinar que

el estadio III, ya corresponde a una fase vitelogénica, como fue el color y la presencia de lípidos del ovario.

Una zona perinuclear (ZP) fue observada en los ovocitos de todos los estadios gonadales, pero con mayor frecuencia en los estadios III y IV. Sin embargo, Kulkarni *et al.* (1991), establecieron que esta ZP era distintiva de la etapa vitelogénica intermedia y tardía. Debido a la discrepancia de ambos estudios, en cuanto a la presencia de este carácter histológico (ZP), no podría considerarse la ZP como un indicador de la madurez de la gónada de *P. clarkii*.

3.4.9.7.- Espacios citoplasmáticos

Fue observado en algunos ovarios de estadios III y IV, pero con mayor frecuencia aquellos del estadio IV, que el citoplasma presentó numerosos espacios de forma irregular. Al respecto, Perryman (1969), mencionó que la reabsorción de un ovario se manifiesta por la aparición de estos espacios a manera de vacuolas en el citoplasma. En la langosta *Homarus americanus*, se ha observado que la reabsorción del ovario ocurre al final de la vitelogénesis secundaria (Aiken y Waddy, 1980).

En diferentes especies de acociles, como *Procambarus simulans* y *Cambarellus shufeldti*, también se ha observado la presencia de espacios que indican la finalización de un ciclo de maduración (Perryman, 1969; Lowe, 1960; Stephens, 1951); además la presencia de vacuolas está relacionada a la forma cuboidal que adquieren los ovocitos (Stephens, 1951). En concordancia con lo anterior, Kulkarni *et al.* (1991), observó que los ovarios postvitelogénicos de *P. clarkii*, sus ovocitos y núcleos están degenerados, los gránulos de vitelo desaparecen y hay espacios blancos citoplasmáticos. Durante la reabsorción los ovocitos no pueden ser distinguidos ya que son muy pequeños (Lowe, 1960; Kulkarni *et al.*, 1991).

3.4.10.- Técnicas histoquímicas

Diferentes técnicas histoquímicas han sido utilizadas para diferenciar glicoproteínas y lípidos en los ovocitos de crustáceos decápodos (Varadarajan y