



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



ORGANOGENESIS DEL SISTEMA  
REPRODUCTOR DE LA CABRILLA ARENERA  
*Paralabrax maculatofasciatus*  
(Percoidei:Serranidae) DESDE LARVA HASTA  
JUVENIL.

TESIS

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

PRESENTA

JULIO SÁNCHEZ GALLEGOS

LA PAZ B.C.S. Diciembre 2006



# INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

## SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 5 del mes de Diciembre del 2006 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

**"ORGANOGENESIS DEL SISTEMA REPRODUCTOR DE LA CABRILLA ARENERA**  
***Paralabrax maculatofasciatus* (PERCOIDEI: SERRANIDAE) DESDE LARVA HASTA JUVENIL"**

Presentada por el alumno:

**SÁNCHEZ**

Apellido paterno

**GALLEGOS**

materno

**JULIO**

nombre(s)

Con registro:

A	0	3	0	4	2	2
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

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

#### LA COMISION REVISORA

Director de tesis  
PRIMER VOCAL

MC. JOSÉ LUIS ORTIZ GALINDO

PRESIDENTE

DRA. LAURA SÁNCHEZ VELASCO

SECRETARIO

DR. JOSÉ DE LA CRUZ AGÜERO

SEGUNDO VOCAL

DRA. ROSA ISABEL OCHOA BÁEZ

TERCER VOCAL

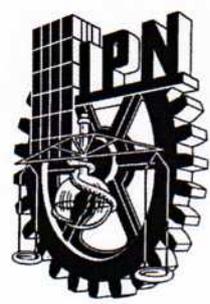
MC. MA. DEL CARMEN RODRÍGUEZ JARAMILLO

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE



L. P. N.  
CICIMAR  
DIRECCION



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

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 8 del mes Diciembre del año 2006, el (la) que suscribe JULIO SÁNCHEZ GALLEGOS alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS con número de registro A030422 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de: MC. JOSÉ LUIS ORTIZ GALINDO y cede los derechos del trabajo titulado: "ORGANOGENESIS DEL SISTEMA REPRODUCTOR DE LA CABRILLA ARENERA  
*Paralabrax maculatofasciatus* (PERCOIDEI: SERRANIDAE) DESDE LARVA HASTA JUVENIL"  
al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: jusanchezg@ipn.mx jortiz@ipn.mx  
Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
JULIO SÁNCHEZ GALLEGOS  
nombre y firma

**ÍNDICE**

Índice	I
Glosario	II
Lista de tablas	VII
Lista de figuras	VIII
Resumen	XII
Abstract	XIII
1. Introducción	1
2. Antecedentes	7
3. Justificación	12
4. Hipótesis	13
5. Objetivos	13
6. Material y métodos	14
6.1. Captura de Especímenes	14
6.2. Inducción al Desove	15
6.3. Incubación	16
6.4. Siembra de eleuteroembriones	16
6.5. Alimentación y crianza larvaria	19
6.6. Obtención de muestras	21
6.7. Proceso Histológico	22
6.7.1 Larvas	22
6.7.2. Juveniles	23
6.8. Procesamiento de imágenes	25
6.9. Caracterización de los estadios de madurez de los oocitos	25
7. Resultados	27
8. Discusión	42
9. Conclusiones	51
10. Recomendaciones para trabajos futuros	53
11. Literatura citada	55

## GLOSARIO

**Alvéolo cortical:** Estructura citoplasmática, sintetizada por el oocito y compuesta principalmente por polisialoglicoproteínas de alto peso molecular. Estas estructuras liberan su contenido al momento de la fertilización, originando la reacción cortical y evitando la poliespermia.

**Atresia:** Proceso mediante el cual se reabsorben los gametos no desovados. En los oocitos, las células foliculares adquieren propiedades fagocitarias, reabsorbiendo el contenido del oocito. En el caso de los machos, la atresia se manifiesta como centros de melanomacrófagos que reabsorben los gametos no fecundados.

**Células foliculares:** Células que envuelven al gameto femenino formando el folículo, estas células proveen los elementos con que se nutre el gameto femenino.

**Células germinales:** Término colectivo para las células de los órganos reproductivos de los organismos multicelulares, que se dividen por meiosis para producir gametos.

**Células sexuales:** Estas células difieren esencialmente de otras células de los animales debido a que experimentan el proceso de maduración o meiosis, después de haber pasado por dicho proceso la célula no puede funcionar como una parte del progenitor si no que antes o después tiene que ser expulsada para la formación de un nuevo individuo.

**Células somáticas:** Todas las células del cuerpo que no son las germinales o sexuales.

**Ciclo gonádico o reproductivo:** Evento repetitivo dentro de las gónadas y que conducen a la producción de gametos.

**Ciclo ovárico:** Serie de estadios de desarrollo por los que pasa la gónada femenina desde el reposo hasta el desove.

**Cigoto:** Célula resultante de la unión de los gametos o de un espermatozoide y de un óvulo. (del griego zygos = "yugo", porque une); óvulo fecundado, Célula diploide (2n) resultante de la fusión de un gameto masculino con uno femenino (ovocélula).

**Desove espontáneo:** En peces se refiere al hecho de que estos logren la puesta de los huevos sin que se de una manipulación manual de los especímenes.

**Determinación sexual:** Término utilizado para describir los procesos genéticos, ambientales, así como las variables que influyen en el sexo de un organismo.

**Diandría:** Capacidad de algunas especies que pueden originar machos por dos vías; los que nacen y se mantienen como tales y los que son derivados de hembras por transformación sexual.

**Diferenciación sexual:** Término utilizado para describir la realización física (morfología celular y molecular) de la determinación sexual en testículos u óvulos

**Dioico:** Relativo a aquellos organismos en los cuales los órganos reproductores femeninos y masculinos se encuentran en diferentes individuos.

**Diploide:** Organismo o fase nuclear que tiene los dos juegos de cromosomas. Número cigótico de cromosomas ( $2n$ ), por oposición al número gamético ( $n$ ) o haploide célula que contiene un par de cromosomas ( $2n$ ) de cada tipo, como las células somáticas.

**Eleuteroembrión:** Fase del periodo embrionario de los peces que comienza desde el momento de la eclosión hasta que se absorbe completamente el saco vitelino y el glóbulo de aceite.

**Epitelio:** Complejo de células estructuradas en forma de capa que limitan una superficie del cuerpo, luz o conducto, están unidas lateralmente, son vasculares y se apoya en una membrana basal.

**Epitelio germinal:** Epitelio peritoneal colonizado por las células germinales primitivas y que al final del desarrollo embrionario se localiza en las gónadas conteniendo las células sexuales.

**Espermatocito:** Célula germinal de la estirpe masculina en vías de maduración.

**Espermatogénesis:** Transformación de las espermatídes en espermatozoides mediante la reorganización del núcleo y del citoplasma junto con el desarrollo del flagelo. Durante este proceso no ocurre división celular.

**Espermatogonia:** Célula germinal masculina, diploide, que se multiplica activamente por mitosis en la zona germinativa de los testículos.

**Espermatozoide:** Gameto masculino maduro, caracterizado por su movilidad, proporcionada por la posesión de uno o más flagelos; en el extremo anterior del espermatozoide, se encuentra el núcleo y el ácrsoma.

**Estrógenos:** Nombre común que se le da a varias hormonas femeninas en los vertebrados.

**Fecundación:** La fusión de dos gametos (espermatozoide y óvulo) que produce un cigoto que desarrollará un nuevo individuo con una herencia genética derivada de sus dos progenitores. Estrictamente la fecundación puede dividirse en dos procesos, el primero corresponde a la unión de los citoplasmas de los gametos (plasmogamia) y el segundo a la fusión de sus núcleos (cariogamia).

**Fecundidad:** Es el número de oocitos en el ovario que pueden madurar durante una temporada reproductiva en particular.

**Folículo:** (L. folliculus, esfera pequeña) Tejido somático que rodea al oocito, compuesto principalmente por las células de la granulosa y la teca.

**Folículo postovulatorio:** Membranas externas que rodean al oocito y permanecen como residuo después de que el oocito ha sido liberado.

**Fotoperíodo:** Duración relativa de los períodos de luz y oscuridad (horas / luz), al que están expuestos los organismos.

**Gametogénesis:** Proceso mediante el cual se forman los gametos en la reproducción sexual. Puede ser difusa, cuando los gametos son producidos en el celoma y son expulsados por un gonópodo; o localizada, cuando los gametos son producidos en un órgano especial (ovario y testículo) formado por un estroma y una cápsula. Salen al exterior por un conducto y un poro genital.

**Gametos:** Células sexuales que pertenecen a la estirpe germinal. Tienen una evolución propia que conducirá a la forma haploide gracias a la reducción cromosómica o meiosis. Su finalidad es el fenómeno de la fecundación, que realiza la fusión de dos gametos, reestableciendo así la diploidía.

**Gónada:** Tejido germinativo en el que tiene lugar el desarrollo de las células reproductoras y que se diferencian en femenina y masculina.

**Gonocorismo:** Condición de una especie en la que los organismos presentan órganos sexuales de un solo sexo, macho o hembra.

**Gránulos de vitelo:** Forma más usual de almacenamiento de reservas en el oocito.

**Haploide:** Célula que contiene solo un miembro de cada cromosoma homólogo (número haploide =  $n$ ). En la fecundación, dos gametos haploides se fusionan para formar una sola célula con un número diploide (por oposición,  $2n$ ) de cromosomas.

**Hermafroditismo:** Condición mediante la cual una proporción de individuos de una población funciona con ambos sexos, de manera simultánea o secuencial en cualquier etapa de su vida.

**Hermafrodita secuencial:** Organismo que en una temporada produce gametos de un sexo y la otra temporada produce otro tipo de gametos.

**Hermafroditismo protogínico:** Modalidad del hermafroditismo en el cual las hembras se transforman en machos funcionales.

**Hermafroditismo protándrico:** Modalidad de hermafroditismo en el cual los machos se transforman en hembras funcionales.

**Lamelas ovígeras:** Prolongaciones de la túnica albugínea hacia el interior del ovario, en ellas ocurren la ovogénesis y vitelogénesis.

**Lúmen:** En los cortes histológicos, el espacio iluminado que se encuentra entre las estructuras o células que se presentan.

**Macho primario:** Es el macho que nace como tal y que no sufre cambio de sexo durante su vida.

**Macho secundario:** Es el macho producto de la reversión sexual de una hembra.

**Meiosis:** Del griego meio = menor; meiosis = reducción.- División celular en la cual la copia de los cromosomas es seguida por dos divisiones nucleares. Cada uno de los cuatro gametos resultantes recibe la mitad del número de cromosomas (número haploide) de la célula original.

**Membrana vitelina:** Formación extracelular que rodea al oocito. Está formada por proteínas fibrilares y mucopolisacáridos.

**Mitosis:** Del griego mitos = hebra, filamento. La división del núcleo y del material nuclear de una célula; se la divide usualmente en cuatro etapas: profase, metafase, anafase y telofase. La copia de una célula. La mitosis ocurre únicamente en eucariotas. El ADN de la célula se duplica en la interfase y se distribuye durante las fases de la mitosis en las dos células resultantes de la división.

**Monoico:** Se dice del organismo en que los dos sexos están representados en el mismo individuo.

**Oocito:** Célula sexual femenina en fase de crecimiento y que experimenta la meiosis.

**Oocito hidratado:** Oocito que está listo para ser liberado y en el que los gránulos de vitelo se han fusionado, ha aumentado considerablemente de tamaño debido a la absorción de agua.

**Oogénesis:** Proliferación de células germinales femeninas a partir de la división mitótica de las oogonias.

**Oogonias:** Células germinales primarias situadas en el epitelio germinal del ovario.

**Ovario:** Glándula genital femenina en la que tiene lugar la ovogénesis.

**Oviducto:** Orificio que forma la vía de paso de los óvulos elaborados en los ovarios que son conducidos al útero y evacuados hacia el exterior en el momento de la puesta. En los vertebrados es un remanente del conducto o canal de Müller.

**Ovulación:** Descarga de los óvulos del ovario, los que generalmente pasan por el oviducto.

**Óvulo:** Célula sexual femenina.

**Pronúcleos:** El núcleo haploide de un gameto.

**Proporción sexual:** La relación de hembras y machos en un grupo de organismos.

**Reversión sexual:** La transformación de un individuo de un sexo en uno del sexo contrario.

**Teca:** Envoltura de tipo conjuntivo que rodea a los folículos en crecimiento.

**Testículo:** Órgano reproductor masculino de los animales donde se producen los espermatozoides.

**Tubos espermáticos:** Conductos que llevan el esperma maduro al exterior.

**Vitelo en peces:** Reservas del oocito formadas de lipoproteínas y fosfoproteínas, derivadas principalmente de la vitelogenina sintetizada en el hígado, son acumuladas en el oocito

**Zona radiada:** Nombre que recibe la membrana vitelina cuando se engrosa y presenta una especie de estriación radial.

## Lista de Tablas

	Descripción	Página
Tabla 1	Formulación del alimento elaborado en el CIBNOR, utilizado durante el experimento a partir del día 40 y hasta el día 130 DDE.	18
Tabla 2	Concentraciones y tiempos de exposición a los diferentes alcoholes del procesador de tejidos.	21
Tabla 3	Características diagnósticas de los oocitos durante los diferentes estadios de desarrollo en <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> .	24
Tabla 4	Relación de la longitud promedio de las mediciones realizadas a los especímenes muestreados de cabrilla arenosa durante todo el experimento.	26

## Lista de Figuras

	Descripción	Página
Figura 1	Desarrollo de la gónada en los vertebrados y localización de crestas germinales.	3
Figura 2	Área de captura de especímenes de cabrilla arenera <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> en las inmediaciones de la Bahía de la Paz punto conocido localmente como el "Merito".	13
Figura 3	Vista superior del SCID: cuenta con una bomba de 1.5 Hp , 6 tanques circulares de fibra de vidrio (T), un sistema de luz ultravioleta U.V, 6 recolectores de plástico para desoves (R) y un filtro eliminador de albúmina (Es).	14
Figura 4	Tolvas cilíndricas de 120 l de capacidad donde se llevó a cabo la incubación de los embriones de la cabrilla arenera <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> .	16
Figura 5	Sistema Cerrado 18 (SC-18) en la Unidad Piloto de Maricultivos (UPIMA). donde se llevó a cabo la crianza larvaria de este trabajo durante 5 meses.	16
Figura 6	Esquema que representa cada uno de las partes del sistema cerrado 18 : (T) tanques, (RA).- Reservorio de agua , (ES).- Filtro eliminador de albúminas, (FM) .- Filtro mecánico, (B).- Bomba de 1Hp, (BE).- Columna de bio-esferas, (L.Act) Sistema de lodos activados ( filtro biológico), (FLUV) .- Sistema de Luz ultravioleta.	16
Figura 7	Calendario de alimentación utilizado durante la etapa de crianza larvaria y preengorda de individuos de cabrilla arenera en la Unidad Piloto de Maricultivos	18
Figura 8	Tipos de mediciones realizada en las larvas y juveniles de la cabrilla arenera donde LN=Longitud Notocordal (mm) y LP=Longitud Patrón (mm).	20
Figura 9	Posición en las que fueron colocadas las piezas de los individuos de cabrilla arenera dentro de los bloques de parafina para su corte en el micrótopo	22
Figura 10	Crecimiento promedio de larvas y juveniles de cabrilla arenera durante todo el experimento donde se observa una tendencia de crecimiento exponencial.	26

---

Figura 11	Comportamiento de la mortalidad registrada en individuos de cabrilla arenera por cada uno de los tanques sujetos a experimentación durante los 5 meses.	27
Figura 12	Descripción breve del desarrollo obtenido durante el tiempo de experimentación en los especímenes de la cabrilla arenera utilizando el criterio de Balon 2002.	27
Figura 13	Micrografía tomada de un corte sagital de <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> con una talla de 2.01mm donde se observan los órganos del tubo digestivo (TD), páncreas (Pc) y notocordio (Nt). 100X, barra = 100 µm. Técnica (H-E).	30
Figura 14	Micrografía tomada de un organismo de 3.4 mm de longitud notocordal donde se puede observar parte de las células del tubo digestivo (T.D.), los tubos colectores(T.C) y las células musculares (C.M) Barra= 10µm. 400X Técnica (H-E).	30
Figura 15	Micrografía tomada de la región media del cuerpo de un individuo de 6.9 mm se observan, los riñones formados (Rn), parte del tejido mesodérmico (Tm) que dará origen a las células germinales, así como parte del estómago (Es) y los paquetes musculares (PM), 100X Barrar = 100 µm. Técnica (H-E).	31
Figura 16	Micrografía de la parte media de un individuo de 11.6 mm, donde se observan los paquetes musculares (PM) y los riñones ya desarrollados (Rn), así como un agrupamiento de 11 células en una banda longitudinal del tejido mesodérmico (PGCs); el estómago también se observa completamente desarrollado( Es). 100X , Barra = 100 µm. Técnica H-E.	32

- Figura 17 Corte transversal en la región media de un organismo de 11.3 mm, las células primordiales germinales se pueden observar como un agrupamiento de 12 células en una prolongación del tejido mesodérmico (PGCs), las células cuboidales de los riñones son fácilmente diferenciadas (Cc) , por el tamaño y forma de éstas, asimismo se observa en el corte las diferentes partes del estómago (Es). 100X , Barra = 100  $\mu$ m. Técnica H-E. 32
- Figura 18 Micrografía de un organismo con 12.29 mm se observa el aumento en tamaño y número de las células germinales (PGCs), parte del tejido mesodérmico (Tm), Las criptas gástricas (Cg)del estómago y el tejido circular del estómago (Tc). 400X, Barra = 10  $\mu$ m. Técnica H-E. 33
- Figura 19 Micrografía tomada de un organismo de 22.45 mm en la cual se aprecia el desarrollo de la gónada y se diferencia claramente las células primordiales germinales(PGCs) se observan también los túbulos conductores de los riñones (Rn), los paquetes musculares (Pm) y dentro del estómago son vistas las criptas gástricas (Cg). 40X, Barra = 100  $\mu$ m. Técnica Tricrómica de Mallory. 34
- Figura 20 Superficie de los primordios gonadales en especímenes de cabrilla arenera desde el día 32 hasta el día 50 alcanzando una talla de 35.45 mm. 35
- Figura 21 Micrografía tomada de un corte de cabrilla arenera de 61.1 mm ( 95 DDE) donde se aprecia el lumen del ovario(lo), varios nidos de oogonias con sus respectivos núcleos(no) así como parte de la túnica albugínea, 400X , Barra =20  $\mu$ m. Técnica H-E. 36

- Figura 22 Micrografía tomada de un corte de cabrilla arenera de 70.8 mm (100DDE) se aprecia el lumen del ovario(lo), pocas oogonias (O), oocitos en etapa de crecimiento en estadio I (Oc), así como parte de la túnica albugínea (ta), 400X , Barra =20  $\mu$ m. Técnica H-E. 37
- Figura 23 Medición del área de oogonias en especímenes de cabrilla arenera en diferentes tallas 38
- Figura 24 Corte transversal de la gónada de un organismo de cabrilla arenera de 97.2 mm (130DDE), se observan los oocitos perinucleolares (Op), los núcleos (N) presentan de 2 a 4 nucléolos (Nu), asimismo los nidos de oogonias (No) se observan pegados en su mayoría al lumen del ovario (Lo) 39
- Figura 25 Comparación del área de los oocitos perinucleolares de especímenes de cabrilla arenera en diferentes tallas mostrando el crecimiento oscilatorio. 39

## RESUMEN

El presente trabajo se llevo a cabo en dos etapas: el cultivo larvario, en un sistema cerrado, de la Unidad Piloto de Maricultivos. Se mantuvieron embriones, larvas y juveniles de cabrilla arenera en condiciones controladas durante 140 días después de la eclosión (DDE). Cada dos días se tomaron muestras para medir la longitud notocordal (larvas) y patrón (larvas postflexión en adelante) de diez ejemplares y posteriormente fueron fijados con formol al 10%. La segunda etapa consistió en el procesamiento y análisis histológico de cada ejemplar. Para el caso de las larvas con una talla menor a 20 mm se realizó una doble inclusión (alginato-parafina) y para los juveniles mayores a 20 mm se les realizaron cortes que dividieron al organismo en dos ó tres partes iguales. Los cortes se realizaron de forma seriada y a un espesor de 4  $\mu\text{m}$ , las técnicas de tinción utilizadas fueron: Hematoxilina-eosina y tricrómica de Mallory. El crecimiento durante la crianza larvaria tuvo un comportamiento exponencial, alcanzando una talla máxima de 98.57 mm al final del experimento. Se observó en los cortes realizados a los ejemplares muestreados el desarrollo y la diferenciación de los órganos adyacentes de la gónada (tubo digestivo, riñones, páncreas, hígado ) sin embargo no es hasta la talla de 10.14 mm donde se observa una banda longitudinal de tejido mesodérmico con una agrupación de 11 células germinales con un área de 223.3  $\mu\text{m}^2$ , la cual da origen a las llamadas crestas germinales; el desarrollo de éstas se puede observar en cortes posteriores, dichas células son ya diferenciadas en oogonias a una talla de 61.6 mm abarcando un área dentro de la gónada de 468.8  $\mu\text{m}^2$ . Asimismo se puede observar parte del tejido germinativo que mantiene agrupadas a estas células, las oogonias alcanzan el estadio de oocito perinucleolar a una talla de 70.8 mm alcanzando cada oocito un área promedio de 799.8  $\mu\text{m}^2$ , a esta longitud se aprecia claramente en el corte las partes de la gónada tal y como lo es el lumen del ovario, la túnica albugínea y así como partes de tejido germinativo. Se concluye que la aparición de células sexuales no depende de la edad del organismo si no de la talla del mismo.

## ABSTRACT

This work had two stages: the cultured larvae in a closed system-18, from the pilot unit of culture of marine fish. The embryo, larvae and the juvenile spotted sand bass were in controlled conditions during 140<sup>th</sup> days posthatching (Dph). Every 2 days took the notochord length (larvae) and standard (postflexion larvae) of 10 individuals and after they were fixed in 10% buffered formalin with phosphates. The second stage, was the process and histological analysis of every sample. In the case of the larvae smaller than 20 mm were realized a double inclusion (alginate – paraffin) and the juveniles bigger than 20 mm were cut in two or three parts. Serial sections were cut at 4  $\mu\text{m}$ , sections were stained with haematoxylin – eosin and Mallory trichromatic. The development larvae was an exponential growth, getting 98.57 mm like the maximum size. At the end of the experiment were seen in cuts the developments and differentiation of the different organs near of the gonad (digestive tract, pancreas, kidney, liver) furthermore when the sample got the size of 10.14 mm were seen the longitudinal band of mesoderm tissues with a group of 11 germ cells with an area of 223.3  $\mu\text{m}^2$  this area gave origin at the germinal crests, in rear cuts were seen the development of this, when these cells have a size of 61.6 mm can be different in oogonias, having an area inside the gonad of 468.8  $\mu\text{m}^2$ , also were seen one part of germinal tissue that groups these cells. The oogonias got the size of 70.8 mm the result were the oocytes perinucleolar. Having every oocyte an area of 799.8  $\mu\text{m}^2$ , in this length were seen clearly the parts of the gonad like are the lumen of ovary, tunica albuginea and different parts of the germinative tissue. In conclusion, the appearance of sexual cells doesn't depend in the age of the organism, depends in the size.

## 1. INTRODUCCIÓN

La producción mundial de la pesca y la acuicultura suministró en el año del 2002, alrededor de 101 millones de toneladas de pescado para el consumo humano, lo que equivale a un suministro per cápita aparente de 16.2 kg (equivalente de peso en vivo), cuyo crecimiento se debió a la acuicultura, dicha actividad tuvo un incremento en los últimos años de 8.9% contra el 1.2% que obtuvo la producción de carne en tierra (FAO, 2006) encontrando a México en el 7º lugar de los diez principales países en producción acuícola.

Frente a este panorama la acuicultura representa una alternativa real e importante para ampliar la oferta alimentaria del país, disminuyendo la presión sobre los recursos pesqueros silvestres, en particular a la ribera (SAGARPA, 2006). En México la acuicultura ha tomado su auge en los últimos años, sin embargo la mayoría de los estudios realizados en este rubro están encaminados a las especies con alto valor comercial, como son : Moluscos, crustáceos y algunos peces marinos, particularmente en los teleósteos existen numerosas especies de las cuales se han estudiado menos del 2 por ciento en el área de la reproducción, la mayoría de estas han sido estudiadas por su importancia económica para la acuicultura.

La familia Serranidae constituye el grupo más diversificado de peces dentro de los perciformes y está compuesta por tres subfamilias, 62 géneros y 449 especies (Nelson 1994). En la región del Pacífico mexicano, las especies de cabrillas con mayor valor comercial son: Mero baya (*Mycteroperca jordani*), cabrilla sardinera (*M. rosacea*), mero brujo (*M. xenarcha*), mero guasa (*Epinephelus itajara*), baqueta (*E. acanthistius*), serrano cabaicucho (*Diplectrum pacificum*), cabrilla extranjera (*Paralabrax auroguttatus*), cabrilla alguera (*P. clathratus*) y cabrilla arenera (*P. maculatofasciatus*) (Heemstra, 1995), esta última alcanza un valor comercial en el mercado regional similar al de otras especies de peces marinos, asimismo la

importancia de la cabrilla arenosa también radica en los torneos de pesca que se realizan para su captura en las costas del estado de California en E.U.A.

La cabrilla arenosa es una especie reportada para la Bahía de la Paz como un hermafrodita protogínico, siendo factible encontrar hembras en etapa de madurez gonádica desde los 150 mm y ejemplares de machos sexualmente maduros desde los 190 mm Lluch-Cota (1995). En cuanto a sus hábitos alimentarios es considerado como un organismo generalista, con preferencias a pequeños peces y crustáceos en algunas épocas del año (Ferry *et al.*, 1997) Su distribución es desde el Estado de Guerrero, en México hasta California, E.U.A. incluyendo el Golfo de California, en la parte interior del mismo tolera temperaturas de 7.5 a 32 °C por lo que se considera una especie euriterma (Thomson *et al.*, 1987).

Sin embargo, cuando se habla de la reproducción en los peces no sólo basta con mencionar el sistema reproductor tanto del macho como el de la hembra, la reproducción abarca también los diferentes órganos que complementan dicha actividad: los conductos que transportan los gametos femeninos y masculinos, las hormonas que liberan dichos gametos, así como los factores que influyen en el mismo (Kardong, 1998).

Al revisar los estudios realizados en el contexto de la reproducción de los peces teleósteos de importancia económica se pueden separar en dos grandes grupos: los estudios dirigidos a especies sometidas a condiciones experimentales controladas, en los cuales existe un desarrollo experimental exhaustivo en el laboratorio. Y los estudios dedicados a las poblaciones de peces en su ambiente natural como las especies que habitan en grandes cardúmenes en el océano y son sometidas a explotación pesquera (Ochoa-Báez, 2002).

En el proceso reproductivo, las células iniciales que dan origen a los gametos son similares y no son esencialmente diferentes de otras células somáticas del cuerpo, excepto que estas células no intervienen en ninguna de las diferenciaciones que sirven para sostener la vida del organismo. En los vertebrados difiere mucho la

rapidez con que se desarrollan diferentes órganos. Por ejemplo, el sistema nervioso se desarrolla por completo principalmente en etapas iniciales de vida, no así los órganos genitales, los cuales tienen un desarrollo más lento, es por ello que cuando las gónadas aparecen en el organismo se puede decir que los demás órganos ya están formados por completo. En los vertebrados

las gónadas se desarrollan a partir del borde superior de la capa visceral del mesodermo, de la placa lateral, en la mitad posterior del cuerpo, aparecen formando una banda longitudinal del epitelio mesodérmico, que tapiza la cavidad del cuerpo, a este engrosamiento se le llama “cresta germinal” (Fig. 1).

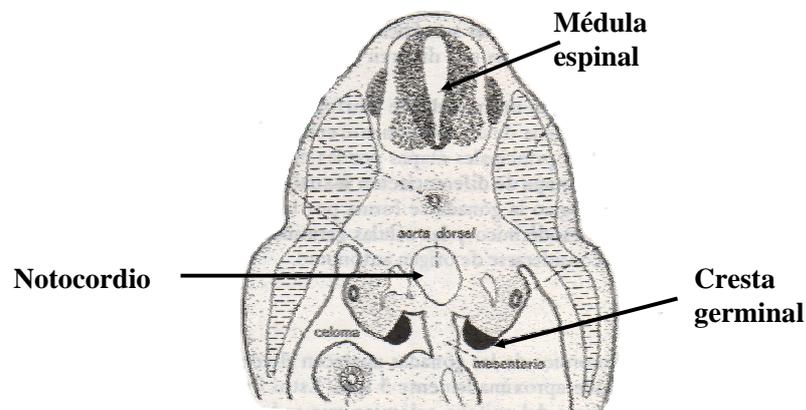


Fig. 1.- Desarrollo de la gónada en los vertebrados y localización de las crestas germinales ( tomado de Balinsky, 1987).

Las células germinales de la mayoría de las especies, comparten características intrínsecas que las hacen diferentes de las demás células somáticas, sin embargo, a lo largo de la historia, la polémica en este tema ha sido la manera de identificar el desarrollo de la línea de células germinales de las demás células en la cavidad abdominal de los organismos, ya que en algunas especies son claramente distinguibles las células germinativas primordiales (PGCs por sus siglas en inglés ). De manera semejante a como ocurre en otros organismos aparecen en el desarrollo inicial, dentro de los tejidos que, no sólo están alejados de las gónadas, si no que además, son de naturaleza extraembrionaria. En consecuencia, hay un proceso de translocación que las conduce hacia los primordios gonadales, donde proliferan e

interactúan con células somáticas para dar comienzo a la foliculogénesis ovárica (Chuaire *et al.*, 2002). El origen de la migración de las células germinales primordiales que dan origen a la gametogénesis en teleósteos ha sido estudiado con diferentes métodos, la mayoría de los estudios en la identificación de las células germinales en etapas iniciales del desarrollo de gónada han estado basados en el tamaño de las células y las diferentes afinidades de la técnica de tinción (Hoar *et al.*, 1983).

Las primeras etapas de desarrollo de los gametos de la hembra, son similares a las presentes durante la espermatogénesis del macho. Las oogonias pasan por una proliferación de divisiones meióticas para llegar a ser oocitos primarios. Los oocitos a diferencia de los gametos masculinos, presentan un periodo de desarrollo que varía de especie a especie, en general los oocitos crecen por la acumulación de vitelo. El sexo de cada individuo depende fundamentalmente de la naturaleza de su herencia cromosómica el cual es un equilibrio entre las potencialidades macho y hembra recibidas de los progenitores (Romer, 1973).

Normalmente cuando se habla de diferenciación sexual (morfológica, celular y molecular) se toman los conceptos de determinación sexual y diferenciación sexual como uno solo, siendo estos totalmente diferentes (Devlin *et al.*, 2002) La diferencia entre estos dos conceptos es, que la determinación sexual describe los procesos genéticos y ambientales que influyen en la determinación del sexo, mientras que la diferenciación sexual se utiliza para describir los procesos físicos en el desarrollo del testículo u ovario (Hendry *et al.*, 2002). De igual manera, el genotipo puede ser alterado o modificado por factores ambientales.

La diferenciación de la gónada en los peces puede tomar varias formas, sin embargo existe una gran variación en los patrones del desarrollo de la gónada de los peces, estas, pueden ser diferenciadas en cualquiera de los dos casos, testículos u ovarios, y retener este sexo el resto de su vida. Sin embargo, los mecanismos de determinación del sexo muestran un equilibrio delicado que en muchos vertebrados,

las gónadas “vacilan” entre las dos posibilidades y pueden tender a desarrollarse a su vez oocitos y espermatozoides (como es el caso de algunos miembros de la familia Serranidae) en algunos organismos maduran ambos tipos de gametos en la misma época de vida, obteniendo así, un animal hermafrodita funcional (Romer, 1973). Se reconocen dos tipos de peces hermafroditas secuenciales los cuales son adultos que cambian de sexo, involucrando la degradación del tejido gonádico funcional y desarrollando tejido funcional del sexo opuesto. Los peces hermafroditas simultáneos son aquellos peces que desarrollan ambos tejidos tanto ovarios como testículos, sin embargo están definidos individualmente dentro del aparato reproductor y pueden llegar a producir tanto gametos masculinos como femeninos (Aerele, *et al.*, 2004). Dentro de este tipo se reconocen los hermafroditas protándricos y protogínicos .

En especies protogínicas un pez joven no presenta tejido testicular, en cambio presenta una gónada inmadura con un desarrollo inicial de ovarios, que continua su curso como diferenciación de hembras. Otras características asociadas con la reversión sexual de especies protogínicas es la presencia de cavidades remanentes de los ovarios en los testículos. En serránidos protogínicos como *Plectropomus maculatus* el conducto espermático no es formado inicialmente, pero bastante esperma es recolectado en la región intragonadal generalmente en la periferia de la misma. (Devlin, 2002).

Con lo antes mencionado, podemos darnos cuenta de la importancia que tiene el estudio de la reproducción en los peces marinos y más aún cuando se trata de especies con alto valor comercial, como es el caso de la especie en estudio. En el caso de la cabrilla arenosa en Baja California Sur, el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas ha estado investigando esta especie por más de 10 años. A pesar de que se ha logrado la producción controlada de semilla de la cabrilla arenosa (Rosales-Velázquez, 1997; Álvarez-González, 2001a, 2001b; Grayeb del Alamo, 2001), aun se tiene el problema de la reproducción precoz, ya que la talla comercial de 250-300 g se obtiene a los 18 meses. Es por esto, que se requiere controlar el

ciclo reproductivo de la especie, para la cual se deben de conocer los detalles anatómicos de la formación del tejido gonádico y su desarrollo. En el presente trabajo se pretende evidenciar mediante estudios histológicos la diferenciación de las células germinales en etapas iniciales del organismo así como la formación de la gónada para que los resultados puedan ser aplicados en la innovación de nuevas biotecnologías para el cultivo de la especie.

## 2. ANTECEDENTES

La estructura de la gónada de los peces es similar a la de otros vertebrados con células germinales asociadas a los soportes de las células somáticas. En algunos organismos la fertilización del oocito ha demostrado un contenido de células especializadas en el citoplasma granular encontrado en el polo vegetal del embrión. Este tipo de células especializadas subsecuentemente desarrollan las células primordiales germinales (PGCs). Una forma de PGCs está estrechamente relacionada con el tejido endodermal y migra vía dorsal por el mesenterio a la región de lo que será la gónada. Este desarrollo ha sido estudiado por Yamamoto, (1969), quien realizó una revisión sobre el tipo de gónadas y hermafroditismo en peces, determinado por la herencia genética e influencia de los esteroides para la determinación sexual, sin embargo este trabajo solo proporcionó de información necesaria para la investigación sobre este tema. Satoh y Egami (1972), realizaron un trabajo sobre el desarrollo de la gónada, así como el origen y la migración de las PGCs, reportando que estas células son claramente observadas después del tercer día de eclosión mediante una técnica *Vasa* en *Oryzias latipes*. Asimismo, existen reportes de Yoshikawa y Oguri (1978), donde reportaron el desarrollo de las gónadas en un cíclido; concluyendo que las células germinales se localizan entre el conducto mesonéfrico y en la región posterior del tronco, a una edad de 15 días después de la eclosión (DDE).

El origen, la migración y el desarrollo de las células germinales también ha sido estudiado por Takashima *et al.*, (1980) en trabajos realizados con *Salmo gairdneri* (= *Oncorhynchus mykiss*), donde determinaron que las gónadas aún indiferenciadas de esta especie se presentan después de dos meses de eclosión concluyendo que la trucha arco-iris es un teleósteo de tipo gonocórico, y que en la mayoría de los vertebrados la migración de PGCs ocurre en el mesenterio por vía dorsal. (Sin embargo, también se han hecho trabajos sobre el desarrollo de la gónada en algunos peces), Timmermans (1987) realizó un trabajo sobre el desarrollo embrionario principalmente en peces de agua dulce, haciendo mención no solo de

las capas germinativas, si no del tubo neural, tubo digestivo y aparición de las gónadas, estas últimas, dicho autor mencionó que se encuentran desde la primera semana de vida de los peces y que las células germinales se van desarrollando en la capa del mesodermo a un lado del periblasto del endodermo, asimismo mencionó que dichas células pueden ser encontradas en la región de los túbulos del mesonefros. Price (1989) realizó una recopilación de trabajos sobre la determinación sexual y los diferentes tipos que esta presenta, tomando como base el trabajo realizado por Yamamoto; él concluyó que existen dos tipos de determinación sexual por caracteres genéticos. La primera los tipos de determinación sexual por caracteres genéticos evolucionaron independientemente durante mucho tiempo y la segunda es que cada uno de estos mecanismos de determinación sexual es una adaptación del organismo a su ambiente.

Timmermans *et al.* (1996) realizaron un estudio sobre la caracterización de antígenos en espermatozoides y células germinales durante el desarrollo de la gónada en carpas, esto mediante la utilización de anticuerpos monoclonados MABs, con ello dichos autores observaron el desarrollo de la gónada aún indiferenciada a 8 semanas después de la eclosión del eleuteroembrión. Chuaire *et al.* (2002) hicieron una revisión sobre el origen y la migración de las células germinales primordiales, concluyendo que después de la tercera semana de desarrollo aparecen las PGCs en el endodermo de la pared posterior del saco vitelino, iniciando a la cuarta semana su trayecto migratorio que las conduce a los pliegues de los primordios gonadales, en un trabajo realizado por Devlin y Nagahama (2002) realizaron un estudio sobre la formación de la gónada en diferentes especies y los factores físicos y ambientales que influyen en la formación de ésta, haciendo una recopilación de estudios hechos sobre el tema, dando información importante no solo para peces marinos si no también para los de agua dulce (*Cyprinus Carpio*). Asoh *et al.* (2002) realizaron un trabajo sobre el desarrollo gonádico de *Dascyllus trimaculatus* encontrando que en peces menores a 25 mm aún la gónada esta indiferenciada. Asimismo Hendry *et al.* (2002) realizaron un trabajo sobre la diferenciación gonadal de *Hippoglossus hippoglossus*, describiendo histológicamente que las células germinales aparecen en

una talla de 38 mm después de que el saco vitelino es absorbido, localizando los primordios gonadales cerca del riñón en la región ventral, este suceso coincide con la etapa de metamorfosis en el organismo, por último los autores observaron que las células germinales se diferencian por completo en ovarios cuando el organismo mide 50 mm de longitud patrón.

Park *et al.*, (2003) realizaron un trabajo sobre la diferenciación sexual del *Pseudobagrus fulvidraco*, donde observaron que al tercer día DDE se da la diferenciación de las células germinales, justo cuando se proporciona la primera alimentación exógena, dichas células aparecen en ambos lados del conducto mesonéfrico en la capa germinal de la cavidad abdominal. Un trabajo importante en la caracterización de la formación de las gónadas es el realizado por Van Aerle, *et al.* (2004) ellos realizaron un estudio sobre la ontogenia de la gónada y el desarrollo del sexo en una carpa (*Pimephales promelas*), observando las gónadas en la región dorsal del peritoneo en ambos lados del mesenterio, empezando aproximadamente entre la mitad del opérculo branquial y la papila urogenital. En el mismo año Bogdanova, (2004) realizó un trabajo sobre el desarrollo inicial de la gónada en *Coregonus lavaretus baeri*, documentando la aparición de las PGCs en esta especie a una talla de  $6.1 \pm 0.31$  y aunque la diferenciación sexual en los organismos se da en tallas avanzadas, el autor hace mención que la diferenciación de la gónada esta influenciada por las temperaturas a las que esta sujeto este organismo. Por otra parte, Gómez y Araújo (2004) realizaron un trabajo sobre el ciclo reproductivo de dos especies de bagres (Ariidae), en lagos de Brasil, demostrando que la formación inicial de las gónadas se da de manera semejante como en los demás teleósteos, por un alargamiento del tejido mesodérmico en la región dorsal de la cavidad abdominal, dichos autores mencionaron 8 etapas para el desarrollo de la gónada tomando la metodología de West (1990).

También Santamaría *et al.* (2004) realizaron un trabajo de descripción histológica sobre la organogénesis en larvas de *Dentex dentex* que va desde el día 0 hasta el día 36 DDE, realizando una descripción morfológica y fisiológica de los

diferentes órganos de esta especie, aunque no mencionaron nada sobre el desarrollo de las gónadas de este organismo, da una clara idea de los sucesos que le anteceden a ésta, asimismo lo mas sobresaliente de su trabajo es el seguimiento morfológico e histológico que desarrollaron para dicha especie.

Respecto a trabajos realizados con cabrillas, Borquez *et al*, (1988) realizaron un trabajo sobre la estructura gonadal e inversión sexual de la cabrilla común *Paralabrax humeralis* haciendo una descripción macro y microscópica del tejido gonádico y su desarrollo, reportando cinco etapas para el desarrollo del ovario y de los testículos. Oda, *et al*. (1993) realizaron un trabajo sobre la actividad reproductiva de tres especies de cabrillas: *Paralabrax maculatofasciatus*, *P. clathratus* y *P. nebulifer*, reportando para las dos primeras especies un intervalo de desove mas frecuente y en horas avanzadas del atardecer, además de ello, hicieron mención de la característica protogínica de *Paralabrax maculatofasciatus* y aunque no menciona exactamente la talla en la que encuentra las gónadas maduras en esta especie si hace mención que el rango de tallas para *Paralabrax maculatofasciatus* fue de 158-340 mm.

Ferreira . (1997) realizó un trabajo sobre el ciclo reproductivo de hembras de *Paralabrax maculatofasciatus* y su importancia para la acuicultura, determinando los picos de reproducción mas altos para esta especie, así como la descripción de tres principales etapas del desarrollo de la gónada durante el año de 1995 y 1996: crecimiento primario, vitelogénesis inicial y vitelogénesis final. Peña-Martínez (2000) realizó un estudio histológico sobre el desarrollo del tubo digestivo en *Paralabrax maculatofasciatus* determinando que las glandulas gástricas en esta especie aparecen en el día 16 DDE, sin embargo aunque el trabajo provee información del desarrollo de diferentes órganos en esta especie, no hace mención alguna de la gónada. Recientemente Ocampo-Cervantes (2002) realizó un trabajo sobre el desarrollo gonádico y actividad reproductiva de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, comprobando histológicamente que dicho organismo tiene una

actividad reproductiva alta mientras la temperatura del agua es baja y que conforme va subiendo la temperatura del agua dicha actividad cesa.

En el presente trabajo, se pretende realizar la identificación, caracterización y seguimiento de las células germinales en la cabrilla arenera. Mediante estudios histológicos se determinará el momento en que las células germinales dan origen a los primordios gonadales, de esta manera se contará con información necesaria para poder aplicar una técnica de masculinización en trabajos futuros, mucho antes de que el sexo se vea diferenciado en este organismo.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de peces marinos se ha enfrentado a diversos problemas los cuales dificultan su óptimo desarrollo. Uno de ellos es el problema de la alimentación, el cual es una de las causas de mortalidad mas altas durante las primeras fases del cultivo, sin embargo, una vez superado o disminuido este problema, el siguiente factor que merma una producción acuícola, es la reproducción precoz de los organismos dando como resultados tallas menores a las comerciales.

El estudio de la reproducción en los peces representa uno de los aspectos más importantes para la acuicultura y las pesquerías debido al valor comercial que algunas especies llegan a alcanzar en el mercado, no solo regional, si no también internacional. En algunas especies la reproducción puede ser controlada o dirigida hacia un sexo determinado por diferentes técnicas, incluso el desarrollo de los órganos sexuales puede ser inhibido mediante técnicas de triploidía. Para desarrollar un cultivo monosexual es conveniente saber en que momento se da la aparición o diferenciación de las células germinales, las cuales darán origen a las gónadas en la mayoría de los vertebrados.

La cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* es una especie relativamente abundante en las aguas costeras de Baja California Sur y de importancia económica en el mercado regional, sin embargo la característica de hermafrodita protogínico de este organismo dificulta su cultivo a nivel comercial, por lo ya antes mencionado. Es por ello que el presente trabajo pretende determinar el momento en que las células germinales se diferencian y como se van desarrollando en el organismo por medio de un estudio histológico, esta información será aplicada en un futuro para la inducción al sexo (masculino) con las diferentes técnicas que existen, con miras a dirigir dicha tecnología hacia un cultivo comercial de cabrilla arenera.

#### **4. HIPÓTESIS**

La diferenciación sexual en la cabrilla arenera durante el desarrollo ontogenético esta relacionada directamente con la talla del individuo y no con la edad del mismo

#### **5. OBJETIVO**

Determinar el tiempo ( en días) en el que se inicia la presencia de las células germinales en la gónada de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* durante el desarrollo larvario.

##### **5.1. OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.- Identificar, localizar y caracterizar el epitelio germinativo de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* durante su desarrollo larvario y juvenil.
- 2.- Describir el desarrollo del epitelio germinativo en la cabrilla arenera durante los primeros 130 días después de la eclosión.
- 3.- Evaluar la primera diferenciación sexual de la cabrilla arenera por medio de un análisis histológico

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Captura de especímenes

La captura de 70 individuos de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* fue realizada en el mes de marzo del 2004, en las inmediaciones de la Bahía de la Paz, en el sitio conocido localmente como el Merito y ubicado entre los 24° 17' LN y los 110° 20' LW (Fig.2). La captura se realizó a bordo de una embarcación menor con un motor fuera de borda de 35 Hp mediante línea y anzuelo y calamar como carnada. Los peces capturados fueron mantenidos en un contenedor cilíndrico de fibra de vidrio con capacidad de 400 l y una fuerte aireación. Se trasladaron a la Unidad Piloto de Maricultivos (UPIMA) en las instalaciones del CICIMAR-IPN, al llegar al laboratorio los peces fueron sometidos a un baño con agua dulce por aproximadamente diez minutos y puestos en cuarentena durante dos semanas.

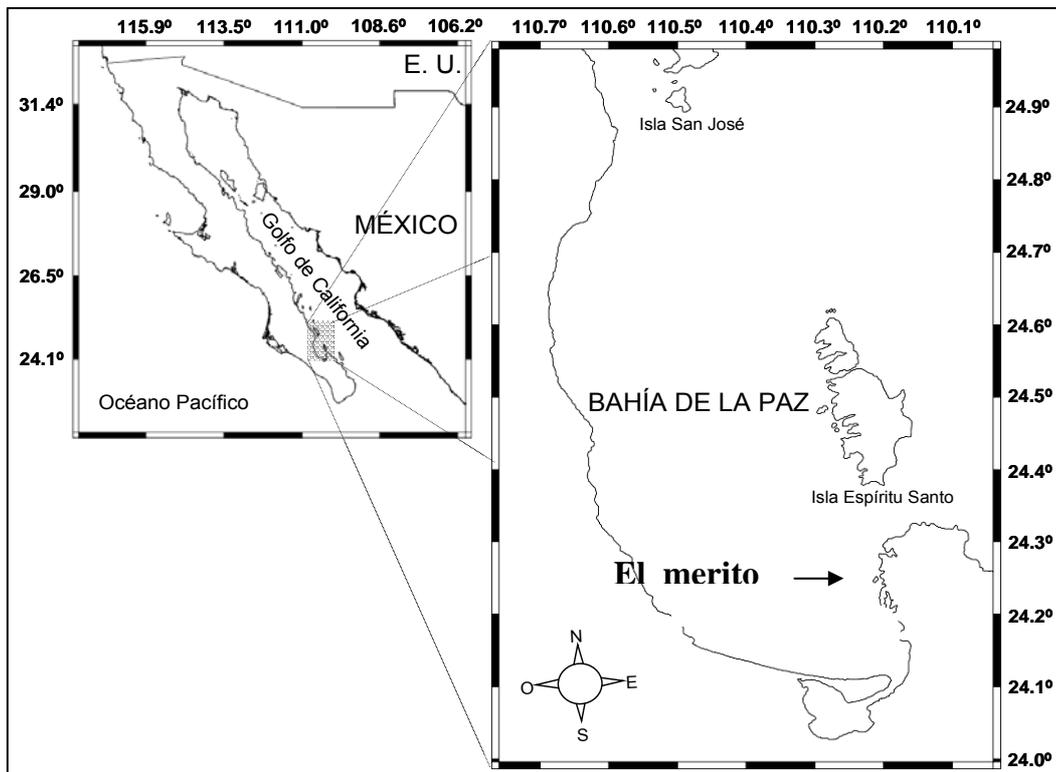


Figura 2 Área de captura de especímenes de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* en las inmediaciones de la Bahía de la Paz punto conocido localmente como el "Merito".

## 6.2. Inducción al Desove

Una vez pasada la cuarentena, las cabrillas fueron trasladadas al Sistema Cerrado para la Inducción al Desove (SCID), en el laboratorio de Biología Experimental, donde se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (23°) y fotoperiodo (13L:11O) para inducir las al desove voluntario Rosales-Velázquez (1997). El SCID cuenta con: 6 tanques circulares de fibra de vidrio con una capacidad de 1100 litros cada uno; un filtro biológico marca Jacuzzi® con un cartucho de 16 µm; un sistema eliminador de albúminas; un sistema de luz ultravioleta con 8 lámparas de cuarzo; una bomba de 1/8 Hp (Fig. 3). Los desoves fueron recolectados por gravedad en recipientes cilíndricos de plástico, localizados en el filtro biológico del sistema (un recolector por cada tanque). Cada recolector tiene tres aberturas en las cuales fue puesta una malla de 200 µm para que el agua pueda pasar a través del recipiente y de ésta manera los huevos se mantengan oxigenados y con un flujo de agua constante.

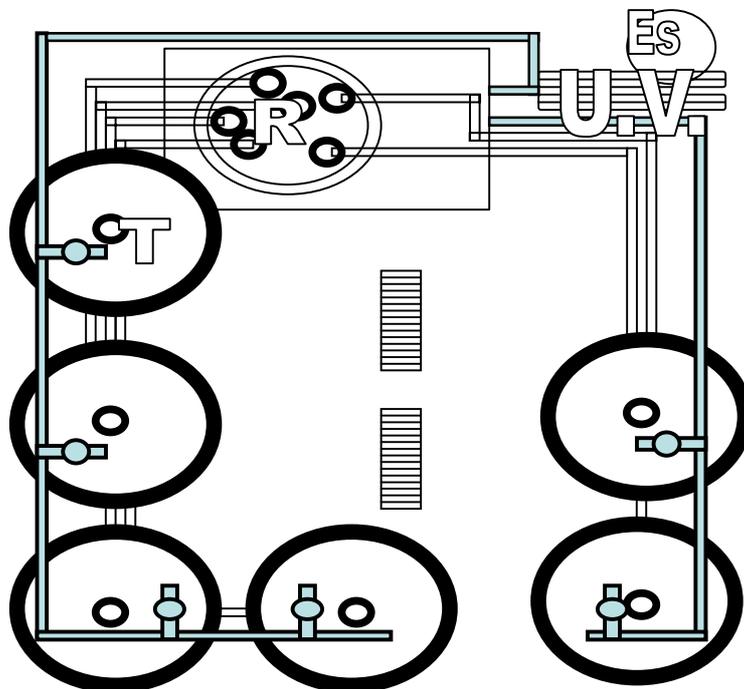


Figura 3 Vista superior del SCID: cuenta con una bomba de 1.5 Hp , 6 tanques circulares de fibra de vidrio (T), un sistema de luz ultravioleta U.V , 6 recolectores de plástico para desoves (R) y un filtro eliminador de albúmina (Es).

### 6.3. Incubación

El desove de 220 ml con una concentración de 1800 embriones/ml aproximadamente, fue llevado a la UPIMA y dividido en 2 partes iguales, éste fue puesto en dos tolvas cilindrocónicas con capacidad para 120 litros de agua marina, a una salinidad de 35‰ ± 0.7 y una temperatura de 25°C ± 0.8 con una oxigenación moderada y constante (Fig. 4) En esas condiciones, los embriones fueron mantenidos por aproximadamente 24 horas hasta la eclosión de los eleuteroembriones. Cabe mencionar que anexo a esta actividad se realizó también un procedimiento para determinar el porcentaje de eclosión del desove ( $96.26 \pm 2.36$ ), el cual consistió en poner dentro de un recipiente de plástico y con flujo constante de agua, un volumen conocido (500 µl ) a las mismas condiciones que las utilizadas durante la incubación. De esta manera se obtuvo el dato de cuantos eleuteroembriones eclosionaron en cada uno de los recipientes. El ensayo para determinar el porcentaje de eclosión fue hecho por triplicado.

### 6.4. Siembra de eleuteroembriones

Los eleuteroembriones obtenidos fueron sembrados en el Sistema Cerrado 18 (SC-18) de la UPIMA siguiendo la metodología de Alvarez-González *et al.* (2001b). Este sistema cuenta con: 18 tanques de fibra de vidrio con una capacidad de 140 l cada uno de ellos; una bomba de 1/8 de Hp marca PerformancePro serie Artesian, modelo A1/8-35-C; una columna de lodos activados marca Sea Storm; un espumador de albúminas marca Euroreef con una bomba sumergible marca Sedra modelo KSP 5000; un sistema de luz ultravioleta con cuatro lámparas marca Tropical Marine Centre modelo PM6; un filtro mecánico de arena marca PAC-FAB modelo Triton II (Pentair Inc., Golden Valley, Minnesota, EUA) un reservorio circular de agua marina hecho de fibra de vidrio con una capacidad de 700 l.

Después de la eclosión se tomó una alícuota de 1000 microlitos para saber cuantos eleuteroembriones había por cada 100 microlitos, de esta manera se logró llevar a cabo la siembra a la densidad de 37 eleuteroembriones por litro, en cada uno de los tanques del SC-18. Para este procedimiento se tomo un recipiente de plástico de 1 litro con el cual se fue sembrando litro por litro hasta completar la cantidad de 4.5 litros por tanque con 3,275 eleuteroembriones aproximadamente cada uno, se utilizó una tabla de números aleatorios para la distribución de los eleuteroembriones.



Figura 4. Tolvas cilindrocónicas de 120 l de capacidad donde se llevó a cabo la incubación de los embriones de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*.



Figura 5. Sistema Cerrado 18 (SC-18) en la Unidad Piloto de Maricultivos (UPIMA), donde se llevo a cabo la crianza larvaria de este trabajo durante 5 meses.

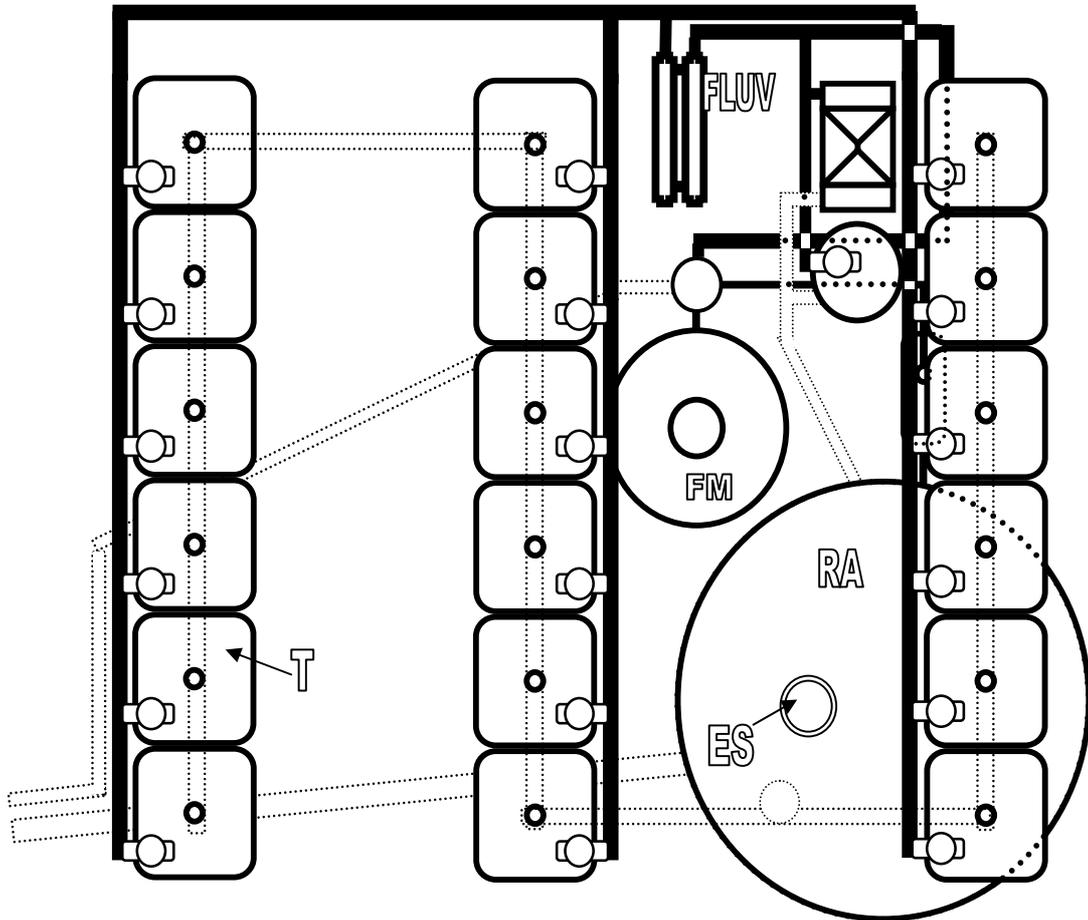


Figura 6. Esquema que representa cada uno de las partes del sistema cerrado 18 : (T) tanques, (RA).- Reservorio de agua , (ES).- Filtro eliminador de albúminas, (FM) .- Filtro mecánico, (B).- Bomba de 1Hp, (BE).- Columna de bio-esferas, (L.Act) Sistema de lodos activados ( filtro biológico), (FLUV) .- Sistema de Luz ultravioleta (Tomado de García-Gómez, 2006).

### 6.5. Alimentación y crianza larvaria

Durante los primeros 12 días después de la eclosión (DDE), se suministraron 1.5 litros de microalga *Nanochloropsis oculata* (Fig. 7), simultáneamente también se suministró como alimento el rotífero *Brachionus plicatillis* hasta el día 26, dividiendo la cantidad total en 4 porciones al día en horarios de 10:00, 12:00, 14:00 y 16:00 horas a una densidad de 2 rotíferos/ml. Sólo los días 2 y 3 los rotíferos se suministraron sin enriquecer, a partir del día 4 en adelante estos pasaron por un proceso de enriquecimiento nutricional, el cual consistió en una inmersión del alimento vivo en la emulsión enriquecedora por un periodo de 6 horas previas a ser suministrados a las larvas de la cabrilla arenosa.

El enriquecedor utilizado en este proceso fue Ratio HUFA<sup>®</sup> (SALT Crek, Inc., SALT Lake City, Uthan, EUA). A partir de los 17 DDE se llevó a cabo una coalimentación, ya que a los peces se les suministraron junto con rotíferos, nauplios de *Artemia franciscana* (Neptune Industries, Salt Lake City Uta EUA) con 1 día de eclosión, en la cantidad de 2 nauplios/ml, nuevamente los dos primeros días (17 y 18) los nauplios se suministraron sin enriquecer, posteriormente pasaron al igual que los rotíferos, por un proceso de enriquecimiento nutricional; aunque esta vez se mantuvieron dentro del enriquecedor por 24 hrs. aproximadamente tal y como lo indicaba la etiqueta del producto para nauplios de artemia. A partir del día 22, se les empezó a suministrar juveniles de artemia sembrados con anterioridad y alimentados con Jade Spirulina<sup>®</sup> (Salt Creek, South Salt Lake City). A partir del día 40 se suministró un alimento inerte elaborado en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR).Tabla No 1.

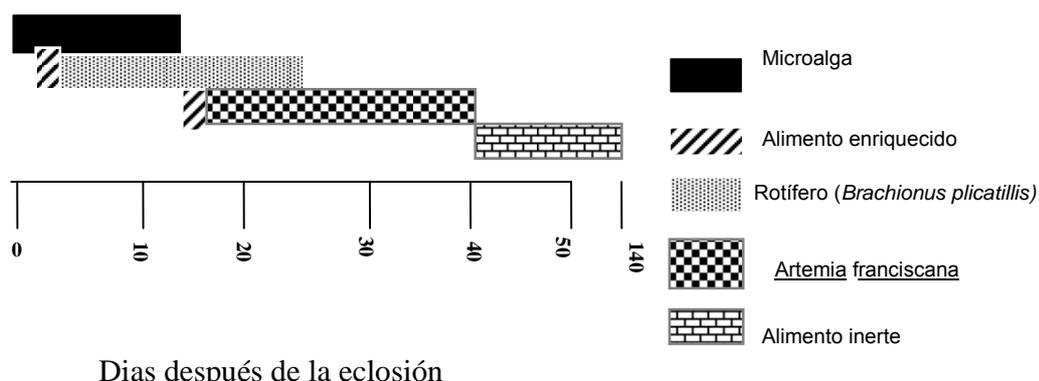


Fig. 7.- Calendario de alimentación utilizado durante la etapa de crianza larvaria y preengorda de individuos de cabrilla arenera en la Unidad Piloto de Maricultivos (tomado de Alvarez-González, 2001, modificado).

Tabla No. 1.- Formulación del alimento inerte elaborado en el CIBNOR, utilizado durante el experimento a partir del día 40 y hasta el día 130 DDE, donde se muestra cada uno de los componentes del alimento (%).

Ingrediente	Clave	ALIMENTO Base húmeda (%)
Harina de sardina	HP0312	35-45
Gluten de trigo	GT0107-1	3-7
Conc. Prot sol pescado	CPSP2000	0-5
Harina de Calamar	HC0303-1	5-10
Harina Integral Trigo	HIT0312	10-20
Aceite de hígado de bacalao	AHB0312-1	4-9
Lecitina Soya	LS0303	4.0
Alginato de sodio	Algimar 0703	2.0
L-lisina HCl	ICN 102218	0.5
Premezcla vitaminas	PreVit0307 (NRC93)	0.7
Premezcla Minerales	PreMin0307 (CIB2001)	1.0
Cloruro de Colina	CloCol65%	0.1
Vitamina C	Stay C 35% a.a.	0.1
BHT	ICN 101162	0.0

La calidad del agua fue monitoreada mediante los análisis de amonio ( $0.31 \pm 0.13 \mu\text{gNH}_4/\text{l}$ ), y nitritos ( $0.62 \pm 0.32 \mu\text{g NO}_2/\text{l}$ ) por medio del método propuesto por Strickland y Parson (1972). Este análisis fue realizado con la ayuda de un espectrofotómetro marca Spectronic modelo Genesys II (Termo Electrón Co., Whatman, EUA). El oxígeno disuelto ( $5.85 \pm 0.75 \text{ mg O}_2/\text{l}$ ), la temperatura ( $23.46 \pm 0.31^\circ\text{C}$ ) y la salinidad ( $35.79 \pm 0.83\text{‰}$ ) se registraron diariamente con ayuda de un equipo multiparametros marca YSI modelo 556MPS (YSI Incorporated; Yellow Spring, Ohio, EUA).

### **6.6. Obtención de muestras**

La toma de muestras se inició a partir de los 10 DDE y terminó hasta el día 130, la toma de muestras fue cada dos días (10,12,14,16...), los peces fueron sacrificados con una sobredosis de anestésico MS-222 ( Metilsulfonato de tricaina - 222), a los especímenes se les tomo una imagen digital con ayuda de un microscopio marca Olympus modelo SZ-ST (Olympus optics, Tokyo, Japón), y una cámara Hitachi modelo KP-D50 Color (Hitachi America, Ltd., Brisbane, California, EUA) y con ayuda del programa ImagePro plus ver. 4 (Media Cybernetics, Maryland, EUA), con la finalidad de realizar la medición de la longitud notocordal y patrón según fuese el caso, las muestras fueron fijadas en una solución de formol al 10% y puestas en viales de vidrio en sus primeras fases y en recipientes de plástico en el caso de los juveniles. Todo ello con la finalidad de conservarlos en buen estado para su posterior análisis histológico.

Para obtener las biometrías de las larvas y juveniles, se tomaron en cuenta las siguientes medidas: longitud notocordal (LN), para individuos con 20 DDE o menos y longitud patrón (LP) para especímenes con 22 DDE en adelante, las medidas fueron tomadas en milímetros (mm) (Fig. 8).

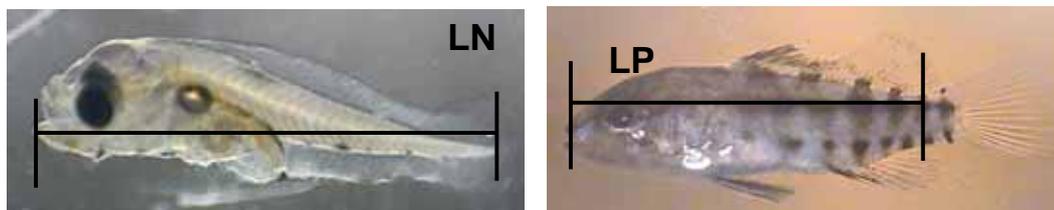


Figura. 8 Tipos de mediciones realizadas en las larvas y juveniles de la cabrilla arenera donde LN=Longitud Notocordal (mm) y LP=Longitud Patrón (mm).

## 6.7. Proceso Histológico

### 6.7.1. Larvas

A partir de las muestras obtenidas a lo largo del experimento, se tomaron 3 individuos de cabrilla arenera de cada uno de los días muestreados y se llevaron al laboratorio de Morfofisiología, en el CICIMAR-IPN. El proceso de deshidratación de las larvas de cabrilla arenera se realizó con un proceso de doble inclusión (Alginato-Parafina) basado en la metodología de Basch (1986), el cual consistió en poner dentro de un recipiente pequeño (1.5X1cm) una cantidad de alginato de sodio al 1%, posteriormente la larva fue colocada en la posición en la que se desea que salga el corte y finalmente se agregó al recipiente unas gotas de cloruro de calcio al 0.25 Molar, con la finalidad de que el alginato endurezca, el resultado de este proceso es una pastilla con la larva dentro de ella, de esta manera las larvas pueden ser puestas en el procesador automático de tejidos Tissue Tek II modelo 4640-B (Miles laboratories Inc. Tokio Japón) para su deshidratación e inclusión en parafina.

La deshidratación consta de hacer pasar la muestra por un baño de alcoholes en concentraciones ascendentes que van desde el alcohol de 80° hasta el alcohol absoluto (Tabla No. 2). Posteriormente pasaron por un baño que contiene alcohol-cloroformo (1:1) y cloroformo respectivamente, esto hace que el agua contenida en los tejidos de la larva sea removida por completo para darle paso a la parafina en su punto de fusión.

Tabla. 2 Concentraciones y tiempos de deshidratación a los diferentes alcoholes del procesador de tejidos a los que fueron expuestas las muestras de individuos de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*.

Alcohol 80°	60 min.
Alcohol 96°	30 min.
Alcohol 96°	30min.
Alcohol 96°	30min.
Alcohol Absoluto	30 min.
Alcohol Absoluto	30 min.
Alcohol Absoluto	30 min.
Alcohol—Cloroformo (1:1)	20 min.
Cloroformo	10 min.
Parafina I	40 min.
Parafina II	40 min.
Parafina II	60 min.

Una vez que las larvas en los bloques de alginato pasaron por el procesador de tejidos, fueron incluidos en bloques de parafina.

Los cortes se hicieron con un micrótopo marca American Optical modelo 820, (Scientific Instrument , Division; Buffalo, NY , EUA) utilizando cuchillas desechables, los cortes fueron seriados y a un espesor de 3-4  $\mu\text{m}$ , puestos en un baño de flotación con agua tibia ( 40°C) y gelatina (Bacto Gelatin, disco certified, Disco Laboratories® ), esto permitió que los cortes se estirasen y recobraran su forma inicial y las muestras se pegaran al portaobjetos. Los cortes seriados fueron puestos con una orientación de izquierda a derecha, dejándolos secar para posteriormente ser teñidos con las técnicas de Hematoxilina – Eosina y Tricrómica de Mallory. Asimismo a cada uno de los portaobjetos se le asignó una clave para poder identificar los cortes al momento de ser observados al microscopio.

### 6.7.2. Juveniles

En esta etapa, los especímenes presentan una calcificación completa en sus estructuras óseas (cráneo, columna, radios de aletas, entre otras) por lo que fue necesario realizar un proceso de descalcificación con EDTA al 5% previo a la

deshidratación, las muestras de los 60 y 70 DDE fueron puestas individualmente en recipientes de plástico con una solución de EDTA al 5% durante 7 días, tiempo necesario para ablandar las estructuras calcificadas. Pasado este tiempo, la deshidratación fue la misma que la de los demás especímenes, sin embargo, antes de que se embebieran en los bloques de parafina, se realizaron cortes que dividen al organismo en dos o tres partes iguales dependiendo del tamaño del ejemplar a incluir, la orientación de las piezas del pez dentro del bloque de parafina, fue de tal manera que los cortes coincidieran con un solo lado del bloque, tal y como se muestra en la figura 9.

Todos los procesos histológicos para peces de 70 DDE en adelante fueron realizados en el Laboratorio de histología e histoquímica del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) en donde a los peces se les hizo una disección de la gónada, a esta edad se alcanza a diferenciar dicha estructura. Los procesos de deshidratación se hicieron manualmente, modificando el tiempo en los alcoholes y poniendo un paso intermedio entre el alcohol y la parafina, el cual fue Xilol-parafina a una concentración de (1:1) por aproximadamente 20 min.

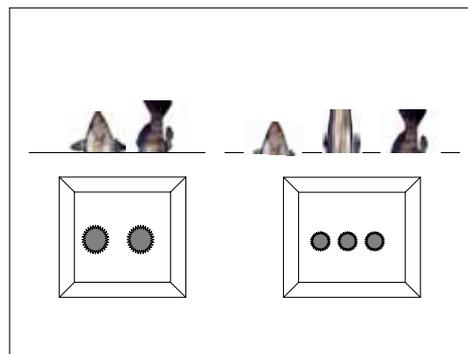


Figura.9.- Posición en las que fueron colocadas las piezas de los individuos de cabrilla arenosa dentro de los bloques de parafina para su corte en el micróscopio.

### **6.8. Procesamiento de imágenes**

Las preparaciones obtenidas de los cortes y las tinciones hechas a las larvas y juveniles de cabrilla arenera fueron observadas en un microscopio Marca Olympus de la Serie BX50 (Olympus optics, Tokyo, Japón.) con cada uno de los objetivos correspondientes.

La digitalización y procesamiento de imágenes fue con la ayuda de una cámara Cool Snap pro Color (Hitachi America, Ltd., Brisbane, California, EUA) y del paquete ImagePro plus ver. 4.5 (Media Cybernetics, Maryland, EUA).

### **6.9. Caracterización de los estadios de desarrollo de los oocitos**

Para la caracterización de los estadios de desarrollo de las oogonias y oocitos, fueron seleccionados sólo las preparaciones que reunieran cierta calidad en cuanto a lo observado al microscopio, como lo es, que el corte estuviera completo y que se pudiera observar con buena definición cada uno de los componentes de dicho corte, para la clasificación del desarrollo de los oocitos, se tomó la utilizada por Ocampo-Cervantes (2002) para esta misma especie (Tabla 3).

Tabla No. 3. Características diagnósticas de los oocitos durante los diferentes estadios de desarrollo en *Paralabrax maculatofasciatus* tomada de Ocampo-Cervantes (2002).

Estadio ovárico	Fase de crecimiento	Estadio del desarrollo del oocito	Diámetro aprox. $\mu\text{m}$	Descripción histológica
I	Crecimiento primario	Oogonia	---	Células localizadas en el epitelio germinal formando nidos.
		Perinucleolar	70	Oocitos de forma poligonal, núcleo con 6 o más nucleolos periféricos.
II	Crecimiento secundario	Alvéolo cortical	130	Oocitos de forma más o menos esféricas, incremento en el diámetro del núcleo, presencia de alvéolos corticales con pequeñas inclusiones en la periferia del oocito.
		Inclusiones lipídicas	185	Presencia de inclusiones lipídicas cerca del núcleo, se observa la zona radiata y los primeros gránulos de vitelo.
		Vitelogénesis	322	Vitelogénesis inicial incremento del diámetro del núcleo, vesículas de lípidos rodeando el núcleo, la zona radiata es más gruesa.
			480	Vitelogénesis final, no hay cambios notables en el diámetro del núcleo pero adquiere una forma estrellada y los gránulos de vitelo son más grandes.
III	Maduración	Hidratación-maduración	793	Se presenta la migración del núcleo hacia el polo animal, los gránulos de vitelo comienzan a fusionarse y al final se disuelven por completo.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Crianza larvaria

Esta primera etapa del experimento tuvo una duración de 5 meses (mayo-septiembre-2004), en donde a los especímenes bajo cultivo se les suministró la cantidad de alimento antes descrito, el crecimiento de los organismos en general, mostró una tendencia de crecimiento exponencial (Fig.10) con un mayor incremento de talla en los días 90, 95 y 100. La mortalidad de los especímenes en el experimento fue mayor en el tanque 14, en donde se registró la mortalidad más alta con 40 juveniles de cabrilla arenera en el día 20 (Fig.11), esto debido a que hubo una fuga de agua en dicho tanque, por lo que se tuvo que reponer más de la mitad del nivel del agua. Después de este día, fue cuando la mortalidad se elevó en los valores antes mencionados, una vez que concluyó el experimento se realizó la biometría con el fin de clasificar a nuestros especímenes de acuerdo con el criterio utilizado por Balon (2002), dichas mediciones de la longitud notocordal y longitud patrón se realizaron en el momento en que se tomó la muestra de los individuos de la cabrilla arenera y de esta manera darnos la idea del desarrollo de los individuos, quedando la gráfica como se muestra en la figura 12. La toma de muestras empezó a los 10 DDE hasta los 130 DDE, los datos de las longitudes se muestran en la tabla 4.

Tabla 4 Relación de la longitud notocordal y longitud patrón promedio de la biometría realizadas a los individuos muestreados de cabrilla arenera durante el experimento.

DDE	Longitud notocordal promedio (mm)	DDE	Longitud patrón promedio (mm)
10	1.89 ± 0.13	48	22.34 ± 0.77
14	3.60 ± 0.12	50	21.99 ± 1.29
16	3.73 ± 0.23	55	35.32 ± 3.03
18	4.02 ± 0.24	60	37.88 ± 2.10
22	5.97 ± 0.38	65	45.92 ± 3.42
24	6.41 ± 0.73	70	40.63 ± 4.23
26	6.61 ± 0.79	75	43.92 ± 9.39
	Longitud patrón promedio (mm)	85	59.71 ± 2.64
28	7.35 ± 0.86	90	50.55 ± 10.54
30	6.38 ± 0.71	95	61.66 ± 6.36
32	10.14 ± 0.95	100	72.61 ± 5.22
34	9.30 ± 0.96	105	67.32 ± 2.42
36	10.57 ± 1.27	110	72.25 ± 3.66
38	10.43 ± 1.47	115	77.31 ± 1.66
40	11.58 ± 1.09	120	80.39 ± 7.23
42	14.25 ± 0.64	125	89.47 ± 6.10
44	14.10 ± 0.56	130	98.57 ± 1.40
46	17.34 ± 1.26		

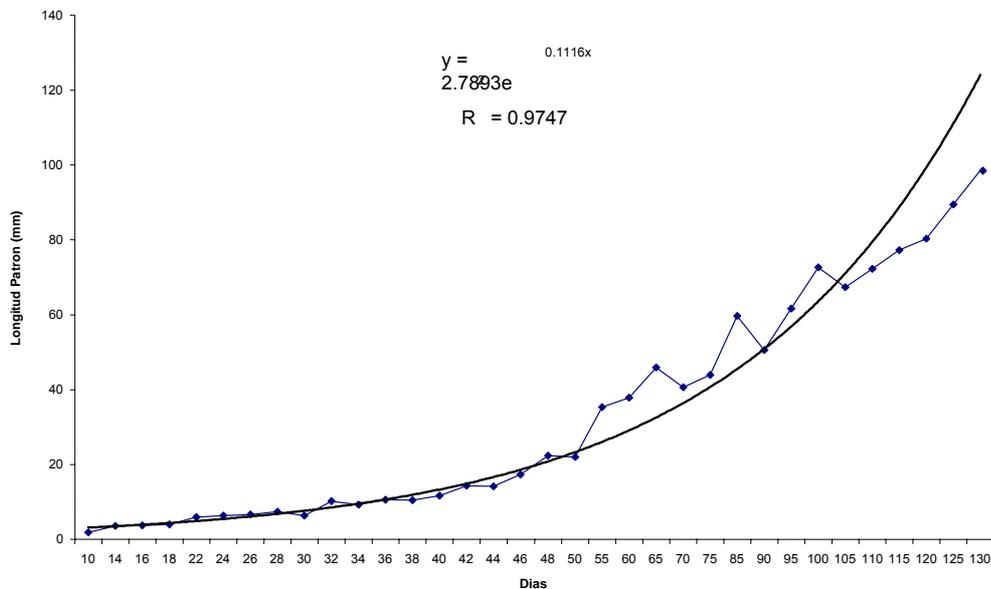


Fig. 10 Crecimiento promedio de larvas y juveniles de cabrilla arenera durante todo el experimento donde se observa una tendencia de crecimiento exponencial.

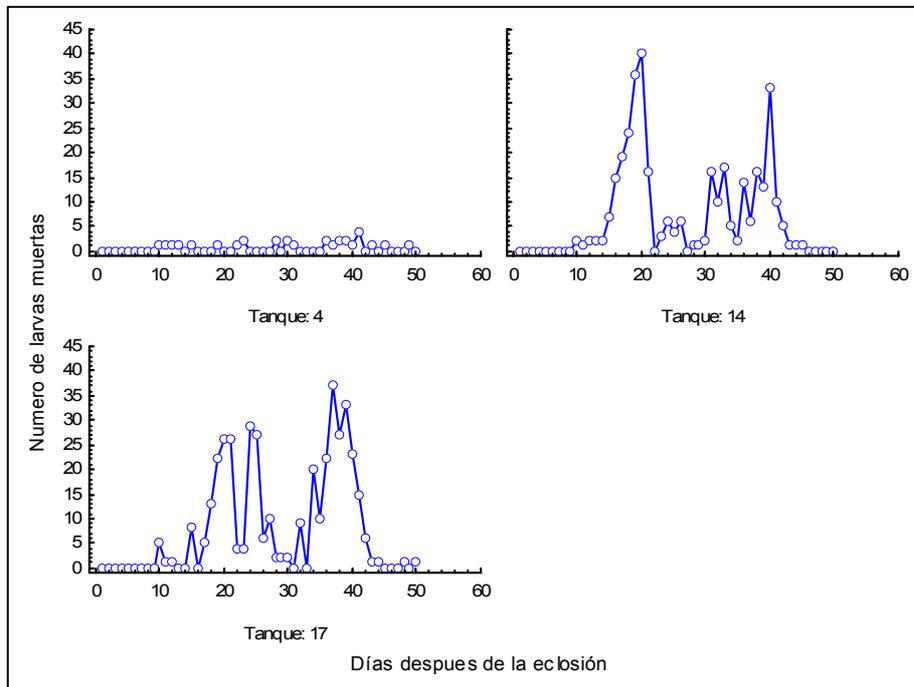


Figura 11. Comportamiento de la mortalidad registrada en individuos de cabrilla arenera por cada uno de los tanques sujetos a experimentación durante los 5 meses.

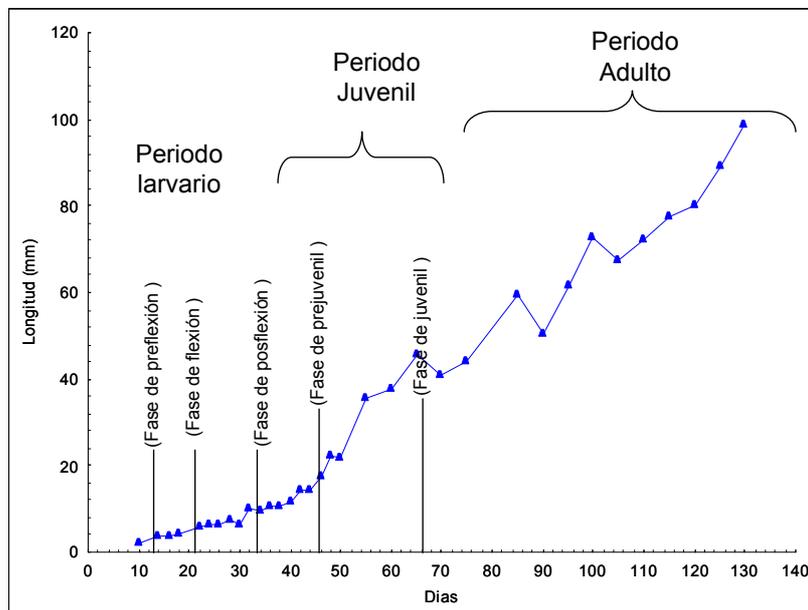


Figura12. Descripción breve del desarrollo obtenido durante el tiempo de experimentación en los especímenes de la cabrilla arenera de acuerdo al criterio de Balon (2002).

## 7.2 Proceso histológico

En el proceso de las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*, se estandarizó la técnica de inclusión doble (alginato-parafina) dando como resultado que el mejor tiempo de exposición de estas muestras en la solución de Alcohol-cloroformo y cloroformo es de 20 y 10 minutos respectivamente, con dichos tiempos las muestras no presentaron alteración en la estructura de los tejidos, cabe mencionar que una sobre exposición a este tipo de solventes puede dañar severamente la muestra al grado de “quemarla”, sin embargo una exposición insuficiente, no permite la completa deshidratación, haciendo difícil la observación al microscopio.

Para los procesos de descalcificación en los especímenes de 70 DDE en adelante, la solución que dio mejor resultado fue el EDTA sobre la solución de ácido fórmico. Las muestras tratadas con EDTA al 5% presentaron una mayor facilidad para la realización del corte, asimismo, la observación al microscopio con esta técnica tiene ventajas sobre la técnica de ácido fórmico, debido a que el ácido al entrar en contacto con las estructuras óseas del organismo genera pequeñas burbujas que limitan la observación de las laminillas, haciendo difícil su interpretación histológica.

En cortes realizados al organismo con una longitud notocordal de 2.01 mm (10 DDE) y procesado con la técnica de inclusión doble, se logra diferenciar algunas estructuras de los órganos principales, como las células del páncreas y la región del tubo digestivo, se observa claramente el notocordio, que será sustituido posteriormente por la columna vertebral, la región cefálica y el globo ocular son claramente distinguibles, sin embargo a esta edad aún no se alcanzan a diferenciar las células germinales en estos especímenes ( Fig. 13).

A una talla de 3.4 mm (12 DDE) se realizaron los cortes transversales y seriados, en los cuales se observaron los paquetes musculares rodeando al tubo neural, así como al notocordio, también se observó el estómago y el intestino

delgado, además se pudieron diferenciar las criptas gástricas, el músculo circular del estómago y la capa de células mucosas que recubren las vellosidades del mismo; debajo del notocordio se pudo observar el desarrollo de los riñones (Fig. 14), a esta edad las células germinales aún no están diferenciadas.

Con una talla de 3.73 mm (16 DDE) la larva fue procesada sin la técnica de inclusión doble, esto dio como resultado que las muestras obtenidas se observaran dañadas en la estructura del tejido muscular y del estómago debido al manejo de la deshidratación y a la inclusión en parafina, en estas laminillas se dificultó la observación de los diferentes órganos del individuo, sin embargo, aún así, en esta talla no se lograron diferenciar las células germinales.

A una talla de 5.97 mm de longitud notocordal (20 DDE) se observaron las tres regiones del tubo digestivo, anterior, medio y posterior, con las diferentes capas de estos (células mucosas, criptas gástricas, músculo circular del intestino, etc.) se observó también la región que ocupa la vejiga gaseosa, sin embargo a esta talla no es posible la identificación del epitelio germinativo ni de las células germinales.

En especímenes con una talla de 6.9 mm y en cortes obtenidos de la parte media del pez, se diferenciaron por completo los órganos adyacentes a la región de la gónada tales como los riñones, en los cuales se observaron los túbulos conductores, así como la parte que ocupa la vejiga gaseosa en la región superior de la parte torácica, sin embargo se observó parte del tejido mesodérmico debajo de estas estructuras, es aquí donde iniciará la formación de las células germinales. También se observó el estómago y parte de los paquetes musculares. (Fig. 15)

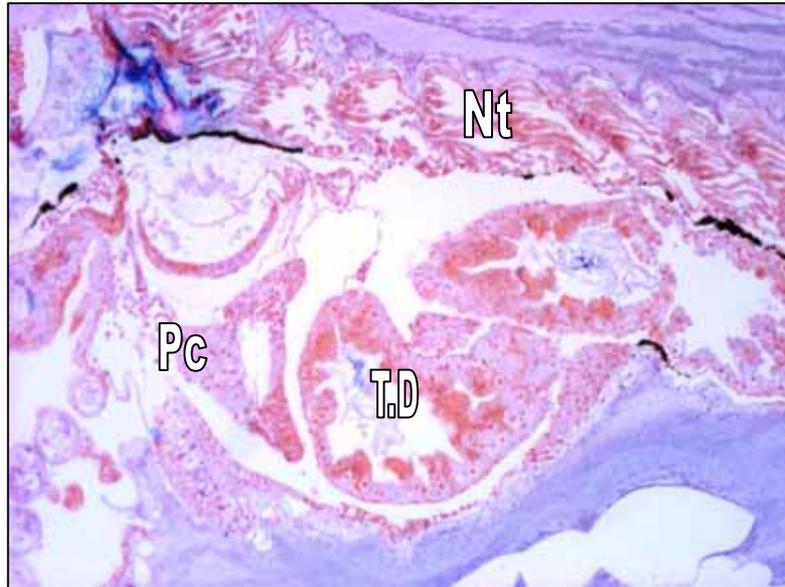


Fig. 13.- Micrografía tomada de un corte sagital de *Paralabrax maculatofasciatus* con una talla de 2.01 mm donde se observan los órganos del tubo digestivo (T.D.) páncreas (Pc) y notocordio (Nt). 100X, Barra=100µm. Técnica (H-E).

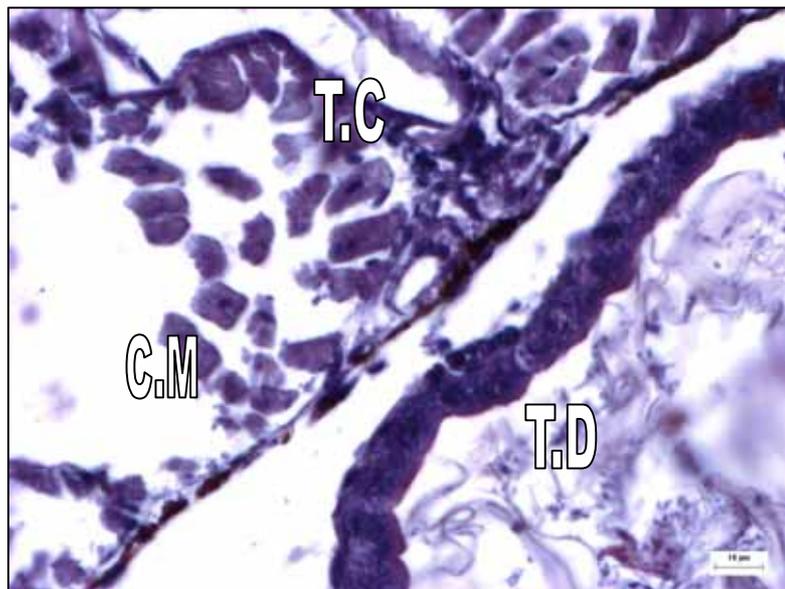


Fig. 14.- Micrografía de un organismo de 3.4 mm de longitud notocordal donde se puede observar parte de las células del tubo digestivo (T.D.), los tubos colectores(T.C) y las células musculares (C.M) Barra= 10µm, 400X Técnica H-E.

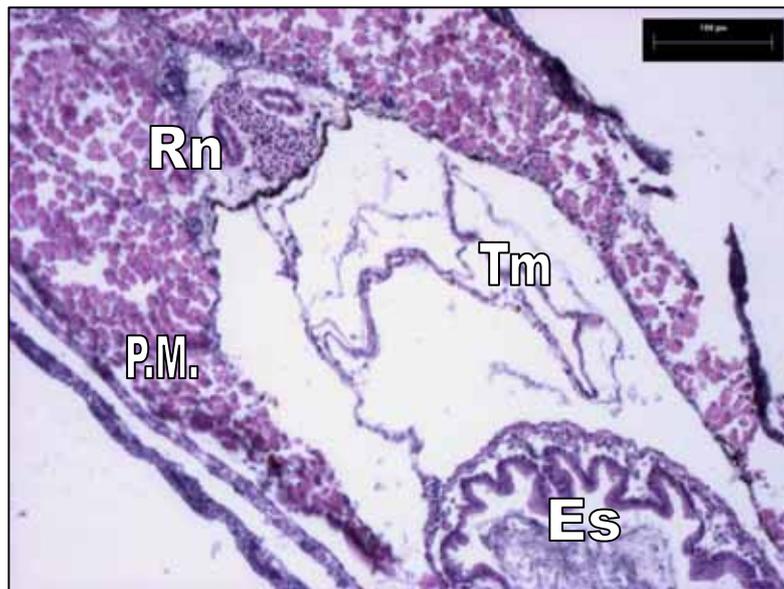


Fig. 15.- Micrografía tomada de la región media del cuerpo de un individuo de 6.9mm se observan, los riñones formados (Rn), parte del tejido mesodérmico (Tm) que dará origen a las células germinales, así como parte del estómago (Es) y los paquetes musculares (PM), 100X Barrar = 100  $\mu$ m. Técnica (H-E).

En cortes realizados a un organismo con una talla de 11.6 mm (32 DDE), se puede observar un grupo de 11 células formando una banda longitudinal de epitelio mesodérmico a un lado del mesenterio dorsal, en esta talla, es donde se puede definir que la formación de las crestas germinales se está desarrollando, sin embargo en la micrografía se observan órganos como el tubo digestivo y los riñones, completamente formados (Fig. 16)

A una talla de 12.12 mm (36 DDE), se sigue observando el agrupamiento de células germinales primordiales, se observa el desarrollo de estas células ocupando un área de 223.2  $\mu$ m<sup>2</sup>, sin embargo esta vez se pueden distinguir con mayor facilidad las crestas germinales, ya que ambas estructuras pueden apreciarse en el mismo corte, se observa la línea longitudinal del tejido mesodérmico que da origen a este agrupamiento de células, la cual en esta talla presenta 12 células germinales primordiales, con un área promedio de 4.62  $\mu$ m<sup>2</sup>, se aprecian aún mejor las células cuboidales de los riñones y las partes del estómago (Fig.17)



Fig.16.- Micrografía de la parte media de un individuo de 11.6 mm, donde se observan los paquetes musculares (PM) y los riñones ya desarrollados (Rn), así como un agrupamiento de 11 células en una banda longitudinal del tejido mesodérmico (PGCs); el estómago también se observa completamente desarrollado (Es). 100X, Barra = 100  $\mu$ m. Técnica H-E.

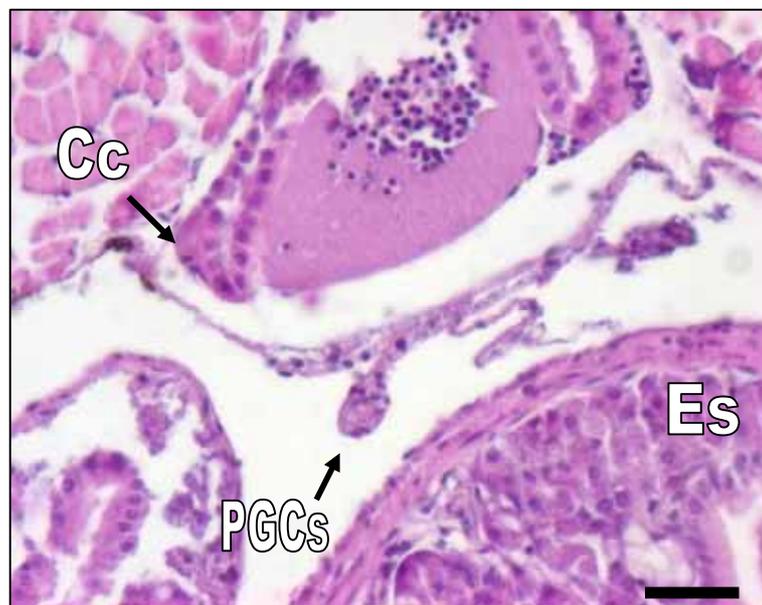


Fig. 17.- Corte transversal en la región media de un organismo de 12.12 mm, las células primordiales germinales se pueden observar como un agrupamiento de 12 células en una prolongación del tejido mesodérmico (PGCs), las células cuboidales de los riñones son fácilmente diferenciadas (Cc), por el tamaño y forma de éstas, asimismo se observa en el corte las diferentes partes del estómago (Es). 100X, Barra = 100  $\mu$ m. Técnica H-E.

El individuo de cabrilla arenera con una longitud de 12.30 mm (40 DDE), presenta un aumento en el tamaño del número de PGCs teniendo hasta el momento una cuenta de 36 células germinales, se sigue observando la prolongación del tejido mesodérmico que sostiene a estas estructuras, a esta talla también se observa con claridad el epitelio germinal que recubre la cresta genital. También se diferencian las criptas gástricas y el tejido circular del estómago. (Fig. 18).

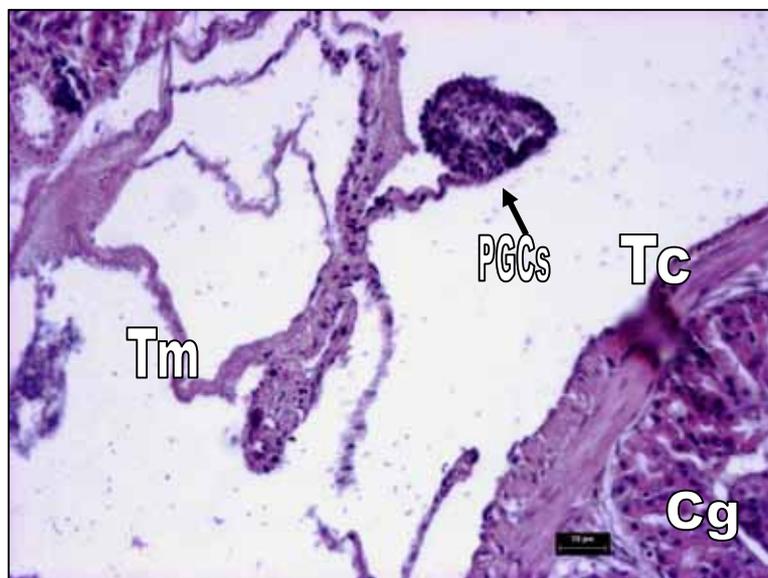


Fig. 18.- Micrografía de un organismo con 12.30 mm se observa el aumento en tamaño y número de las células germinales (PGCs), parte del tejido mesodérmico (Tm), Las criptas gástricas (Cg) del estómago y el tejido circular del estómago (Tc). 400X, Barra = 10  $\mu$ m. Técnica H-E.

A los 22.45 mm (50 DDE), se observó mayor desarrollo de la cresta germinal es aún mayor, se aprecian las dos estructuras sostenidas por la prolongación del tejido mesodérmico, así como un grupo aún mayor de células dentro de ellas, también observamos los paquetes musculares, el estómago y parte del tubo digestivo (Fig.19).

Los especímenes de 37.8 y 40.6 mm (60 y 70 DDE respectivamente), presentan un aumento en el tamaño de la gónada indiferenciada, sin embargo las células germinales se pueden diferenciar fácilmente del epitelio germinativo que las recubre y las mantiene agrupadas, asimismo se observan también las demás estructuras adyacentes a la gónada (estómago, paquetes musculares, riñones y el tubo digestivo).

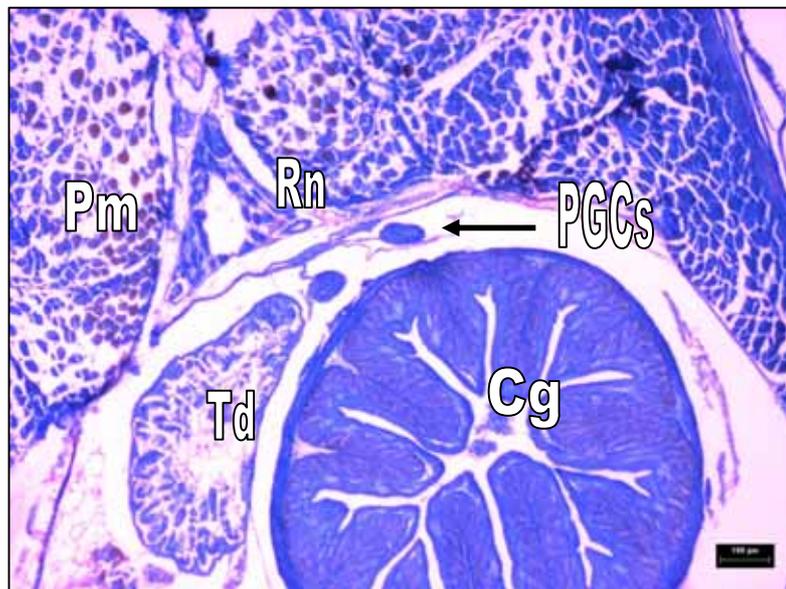


Fig.19.- Micrografía tomada de un organismo de 22.45 mm en la cual se aprecia el desarrollo de la gónada y se diferencia claramente las Células primordiales germinales (PGCs) se observan también los túbulos conductores de los riñones (Rn), los paquetes musculares (Pm) y dentro del estómago es son vistas las criptas gástricas (Cg). 40X, Barra = 100  $\mu$ m. Técnica Tricromica de Mallory.

A partir de la talla en la que se muestran las células germinales 11.3 mm (32 DDE), se realizó el seguimiento del desarrollo de dichas estructuras, así como del aumento en la talla de las mismas, en cada uno de los especímenes procesados tal y como se muestra en la fig. 20, el área de los primordios gonadales va en aumento dependiendo de la talla del individuo, cabe mencionar que la medición de células germinales comprende las tallas desde 11.3 hasta 37.8 mm de longitud patrón.

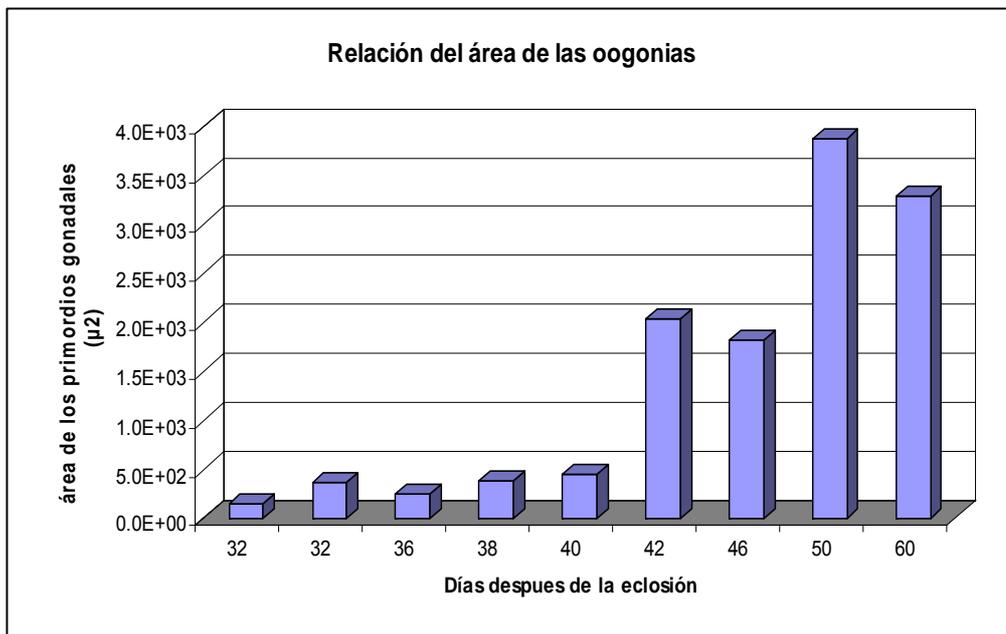


Fig. 20.- Superficie de los primordios gonadales en especímenes de cabrilla arenera desde el día 32 hasta el día 60 alcanzando una talla de 35.45 mm.

A una talla de 45.9 mm se pudo observar que hay un desarrollo de la gónada, la cual está indiferenciada.

A los 65.29 mm de longitud patrón se observaron las células diferenciadas en oogonias inmersas en el epitelio germinativo, en esta talla se considera que las oogonias alcanzan el crecimiento primario y están constituidas por un citoplasma escaso con el núcleo visible, sin embargo presentan solamente un nucléolo, el área promedio de estas oogonias es de  $27.38 \pm 9.1 \mu\text{m}^2$ , asimismo en los cortes realizados a este organismo se observa la parte del lumen del ovario, varios nidos de oogonias con núcleo y la túnica albugínea (Fig. 21).

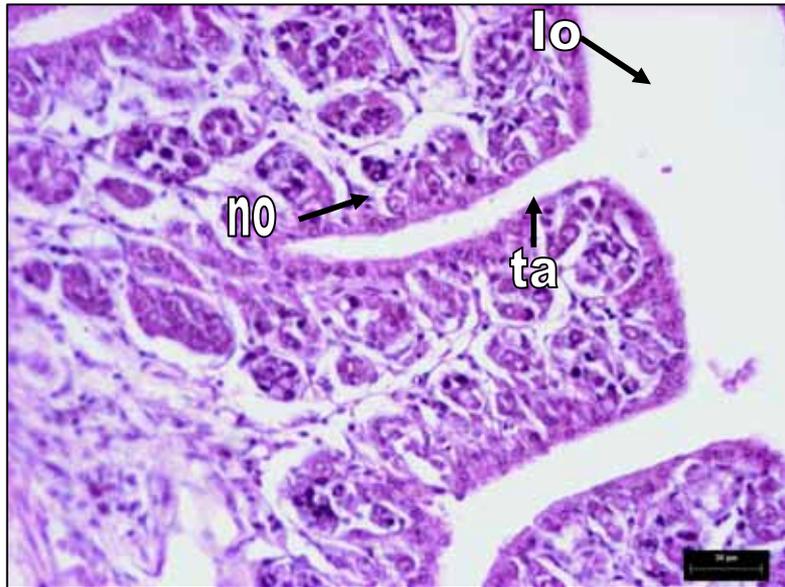


Figura 21. Micrografía tomada de un corte de cabrilla arenera de 61.1mm ( 95DDE) donde se aprecia el lumen del ovario(lo), varios nidos de oogonias con sus respectivos núcleos(no), así como parte de la túnica albugínea (ta), 400X , Barra =20  $\mu$ m. Técnica H-E.

El desarrollo de la gónada se ve en cortes posteriores, en especímenes con talla de 70.8 mm, donde las oogonias aumentan de tamaño y se observan algunos oocitos en crecimiento primario dentro del estadio II, en esta etapa los oocitos tienen un área promedio de  $468.8 \mu\text{m}^2$ , presentan en su mayoría formas redondeadas y poligonales, el núcleo es claramente visible, se aprecian algunos nidos de oogonias con núcleo y parte del lumen del ovario (Fig. 22)

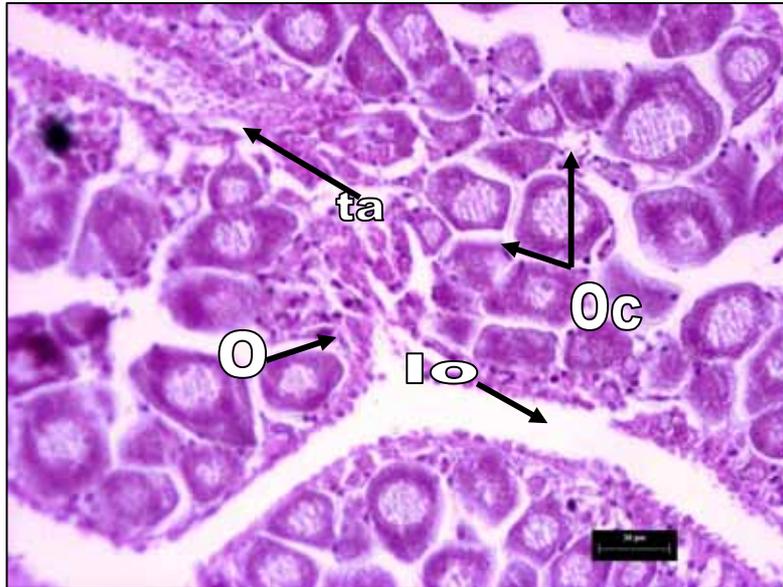


Figura 22. Micrografía tomada de un corte de cabrilla arenera de 70.8 mm (100DDE) se aprecia el lumen del ovario(lo), pocas oogonias (O), oocitos en etapa de crecimiento en estadio I (Oc), así como parte de la túnica albugínea (ta), 400X , Barra =20  $\mu\text{m}$ . Técnica H-E.

A una talla de 69.9 mm de longitud patrón se observaron que los oocitos perinucleolares ocupan la mayoría de la región de la gónada alcanzando un área promedio de  $624.09 \mu\text{m}^2$ , asimismo se diferencian las capas foliculares de los mismos, sin embargo también se observan algunos nidos de oogonias cerca de los oocitos que presentan alveolo cortical, aún que estos son escasos a diferencia de tallas anteriores, se muestra que el crecimiento de estos va en aumento, asimismo se hace una comparación del crecimiento de las oogonias y los oocitos desde tallas de 35.45 mm hasta los 68.99 mm (Fig. 23), cabe mencionar que las tallas de los organismo que presentan un área mayor a las de las demás oogonias, corresponden también a las tallas en las que el crecimiento del mismo organismo fue mas lento.

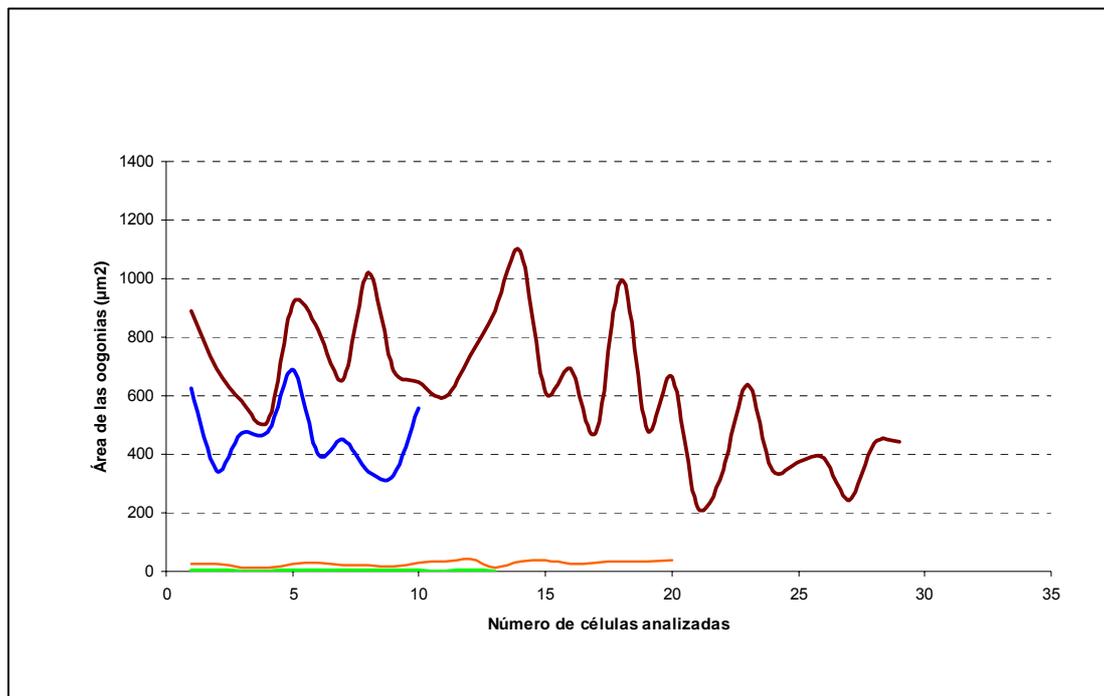


Fig. No. 23. Medición del área de oogonias en especímenes de cabrilla arenera a diferentes tallas.

En los cortes realizados a especímenes con una talla de 97.2 mm, se observa gran parte de la gónada con oocitos perinucleolares, mostrando en la mayoría de ellos la disposición de 2 ó 4 nucléolos, cuya forma esférica se encuentran principalmente en la periferia del núcleo, el área promedio para los oocitos de esta talla es de  $799.8 \pm 269.3 \mu\text{m}^2$ , y para los nucléolos es de  $207.3 \pm 74.8 \mu\text{m}^2$ , los nidos de las oogonias siguen observándose en estas laminillas, sin embargo la presencia de dichos nidos es aún menor que en tallas anteriores, asimismo el lumen del ovario se puede observar con facilidad.(Fig. 24).

Asimismo se realizó la medición y comparación del crecimiento de los oocitos perinucleolares en especímenes con tallas que van desde los 72.3 hasta los 97.2 mm mostrando un crecimiento oscilatorio similar en los especímenes de 80.36 y 92.7 mm (Fig. 25).

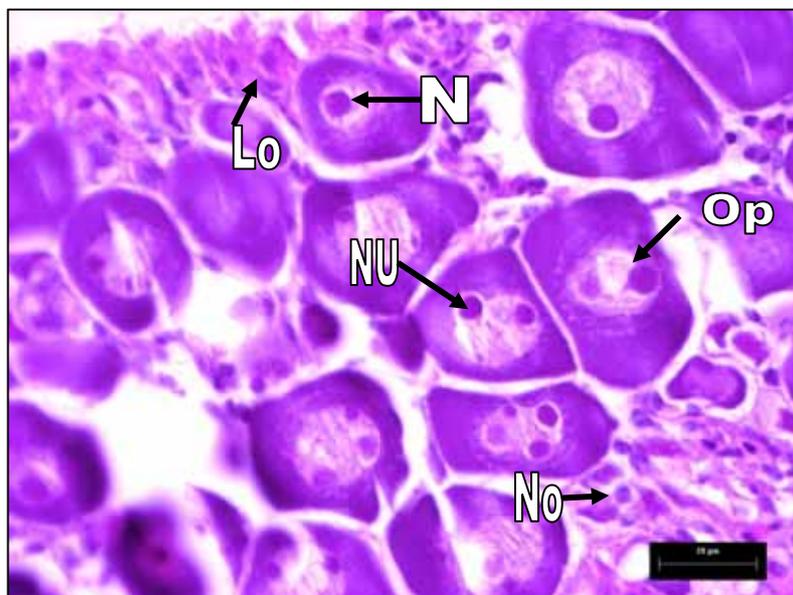


Figura No. 24. Corte transversal de la gónada de un organismo de cabrilla arenera de 97.2 mm (130DDE), se observan los oocitos perinucleolares (Op), los núcleos (N) presentan de 2 a 4 nucléolos (Nu), asimismo los nidos de oogonias (No) se observan pegados en su mayoría al lumen del ovario (Lo).

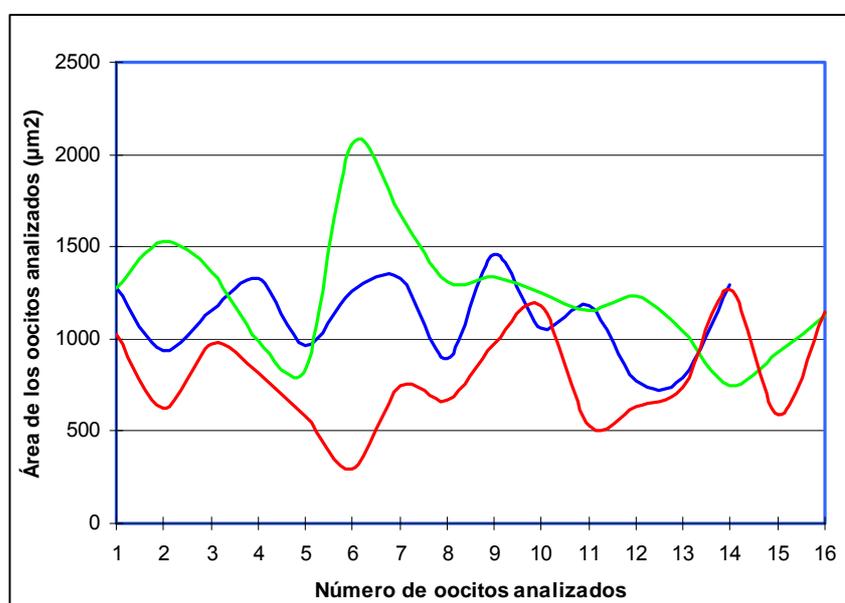


Figura No. 25. Comparación del área de los oocitos perinucleolares de especímenes de cabrilla arenera en diferentes tallas mostrando el crecimiento oscilatorio.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Crianza Larvaria

Los resultados obtenidos en las biometrías realizadas a los especímenes de *Paralabrax maculatofasciatus* mostraron durante todo el experimento un crecimiento exponencial con una curva de crecimiento similar a la obtenida por Alvarez-González *et al.* (1999) para la misma especie. Asimismo los resultados en el crecimiento de la cabrilla son similares a los obtenidos por Santamaría *et al.* (2004) durante el larvicultivo de *Dentex dentex*, trabajo enfocado a la organogénesis de esta especie, en donde la metodología de alimentación coincide en la mayoría de los puntos a la realizada en este estudio, así como la densidad propuesta para el larvicultivo.

La diferencia de tallas observada en este experimento corresponde a lo citado por Van Aerle *et al.* (2002), estos autores mencionaron que la disponibilidad del alimento en el medio influye para un óptimo desarrollo del organismo y que la diversidad de tallas dentro de un mismo cultivo esta influenciada por diferentes factores. Por otra parte Alvarez-González *et al.* (2001) demostraron para la especie en estudio que la densidad en la que se obtuvo mejores resultados en cuanto al crecimiento, es la de 50 o 100 individuos/litro. Aunque la densidad manejada para este experimento estuvo por debajo de los 50 individuos/litro, se presentó una mayor mortalidad en uno de los tanques en los primeros 13 días del cultivo. La cantidad de alimento suministrada fue la misma que los demás tanques corroborando lo citado por los dos autores anteriores, ya que fue en este tanque donde se observaron los organismos con mayor talla en menor tiempo durante todo el cultivo, esto se debió a que hubo una mayor heterogeneidad de tallas, lo cual provocó que se presentara canibalismo.

Al analizar la curva de crecimiento exponencial para este experimento se pudo observar que hay una etapa en la talla de 11.6 mm de longitud patrón en donde el desarrollo somático no experimentó un incremento. Al analizar los cortes histológicos

de los individuos de estas tallas, es aquí donde se da la primera diferenciación de las células germinales, las cuales comienzan su desarrollo a partir de este momento, esto es similar a lo reportado por Hendry *et al.* (2002) en *Hippoglossus hippoglossus* ya que dichos autores mencionaron que la diferenciación de las gónadas en dicha especie coincide con la etapa de metamorfosis del organismo, por lo cual su crecimiento somático se ve detenido para ocupar la mayor parte de su energía en la migración del ojo y la obtención de una mayor altura del cuerpo. Indar (1994) mencionó que el lento desarrollo y bajo incremento en la talla de individuos de *Hoplosternum littorale* coincide con el periodo de transición del organismo de embrión libre a larva siendo en esta etapa el alimento el factor más importante. Por otra parte, Luquet y Watanabe (1986) mencionaron de que el momento en donde las células germinales aparecen, es justo ahí cuando el alimento es importante, ya que el organismo utiliza la mayor parte de éste para el desarrollo de las células sexuales.

Otro punto en la problemática de un cultivo larvario es el alto porcentaje de mortalidad en los peces, son varios los autores que han mencionado que el punto mas crítico o también llamado “cuello de botella” se da en la crianza larvaria (Timmermans 1987; Hendry *et al.*, 2002; Alvarez-González 2003; Santamaría *et al.*, 2004) y aunque la metodología de siembra fue tomada de Alvarez-González *et al.* (2001), el porcentaje de supervivencia obtenida en el presente trabajo es considerada como buena, con un 8.4 % en comparación con lo obtenido por dicho autor en experimentos con la misma especie en condiciones similares (11.1%).

Como se mencionó anteriormente, la temperatura del agua durante todo el cultivo larvario, permaneció constante, y aunque diversos autores ( Lim B.S. *et al.*, 2003; Goto-Kazeto *et al.*, 2005; Suquet *et al.*, 2005) manejaron que el desarrollo gonadal esta influenciado por la temperatura; cabe mencionar que en este trabajo no se pudo realizar dicha comparación. Además de que los objetivos no eran con ese fin, no hubo variación en la temperatura, por lo que se descarta que la aparición tardía de las gónadas a una talla de 10.57 mm de longitud patrón haya sido por este factor. Aunque la temperatura se mantuvo constante durante todo el experimento, el

desarrollo de la gónada se pudo diferenciar hasta una talla de 10.57 mm por lo que en la mayoría de los trabajos sobre el desarrollo gonádico o la actividad reproductiva de esta, se menciona la importancia de la temperatura, ya que esta influye significativamente para la aparición de dicho órgano (Pawson *et al.*, 2000; Marañón-Herrera *et al.*, 2001; Ocampo-Cervantes 2002), sin embargo la temperatura se mantuvo constante durante todo el experimento.

## 8.2. Manejo de muestras

En cuanto a la obtención de muestras de los individuos, son varios los autores que manejan preferentemente el anestésico MS-222 (Metilsulfonato de tricaina) sobre los demás anestésicos, especialmente para los trabajos histológicos, es recomendado que los peces sean sacrificados con una sobredosis de dicho anestésico, de esta manera se redujó el riesgo de que un tejido u órgano halla sufrido alguna alteración en su estructura celular debido al estrés que sufren los especímenes al ser manipulados, dando como resultado una mejor observación y diferenciación de cada una de las laminillas vistas al microscopio óptico (Rosales-Velázquez, 1997; Tatsuya *et al.*, 2002; Juhani & Scherck, 2003; Santamaría *et al.*, 2004). De igual manera, de la buena fijación de las muestras depende en gran parte el éxito de la observación al microscopio para su análisis histológico (Peña-Martínez, 2000; Crespo *et al.*, 2001; Tatsuya *et al.*, 2002; Ochoa-Baéz com. pers.) durante este trabajo, se contó con muestras de ejemplares de cabrilla arenera fijadas con formol al 4%, obtenidas de experimentos anteriores bajo las mismas condiciones de larvicultivo realizadas por Alvarez-González (2003), cabe mencionar que al analizar estas muestras histológicamente para darnos una idea del desarrollo gonádico, la estructura celular de algunos órganos presentaban una mala fijación por lo que no se pudo observar con claridad las estructuras que se buscaban, esto seguramente se debió a que no se uso formol al 10% tamponado con fosfatos.

En cuanto al manejo y procesamiento histológico de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus* los especímenes que fueron procesados con una doble inclusión

de alginato-parafina, mostraron una menor ruptura en los cortes observados al microscopio, esto facilitó la observación de cada uno de los órganos del individuo, no así los especímenes que solamente se trataron con la inclusión en parafina, esto concuerda con lo establecido por Basch (1986), sin embargo aún que se siguió la misma metodología y ésta fue fundamentada en organismos planctónicos se logró estandarizar los tiempos de exposición a los diferentes solventes para esta especie. Con respecto a la disección de tres partes iguales a especímenes mayores a una talla de 40.62 mm se concuerda con Borquez *et al.*, 1988 y Asoh & Kasuya 2002, ellos mencionaron que este tipo de disección es una manera fácil de obtener cortes en mejor estado para el estudio de la estructura gonadal en los peces,

Para una buena apreciación de los cortes histológicos realizados en los especímenes muestreados y específicamente para identificar la determinación o diferenciación sexual, varios autores manejan la importancia de cortes seriados que van desde las 5 hasta las 10  $\mu\text{m}$ . (5-10  $\mu\text{m}$ . Van Aerle *et al.* 2004; 6  $\mu\text{m}$ . Hendry *et al.* 2002; 6  $\mu\text{m}$ . Asoh & Yosikawa 2003; 5-9  $\mu\text{m}$ . Santamaría *et al.* 2004) no obstante el espesor que dio mejor resultado en este trabajo fue el de 3  $\mu\text{m}$ . en el caso de especímenes con una talla menor a la de 10.14 mm y de 5  $\mu\text{m}$  para los especímenes de dicha talla en adelante. En cuanto a los procesos de descalcificación que se llevaron a cabo en este trabajo, obtuvimos un mejor resultado con la solución de EDTA al 5% que con la de ácido fórmico, la solución en la que los especímenes fueron fijados, actuó por sí misma como descalcificante (Ochoa-Báez, com. pers.), sin embargo al introducir a los especímenes en la solución de ácido fórmico, este ocasionaba una efervescencia en las estructuras del organismo, no así la solución de EDTA. la cual era cambiada cada 48 hrs para que la eficiencia de la solución descalcificante fuese la misma.

Las técnicas de tinción utilizadas en este trabajo fue la de Hematoxilina-eosina, la cual es utilizada en la mayoría de los trabajos histológicos para observar células de la gónada así como el desarrollo de la misma (Peña-Martínez, 2000; Asoh y Kasuya, 2002; Devlin & Nagahama, 2002; Ocampo-Cervantes, 2002,) En este tipo

de tinción al ser una coloración topográfica se pudo observar con claridad tanto las células germinales como cada uno de los órganos de las larvas, una ventaja más de dicha tinción es que su costo no es elevado en comparación con otras técnicas histoquímicas como la de Vasa (Devlin y Nagahama 2002).

### 8.3. Ontogenia del desarrollo

En cuanto al desarrollo larvario de *Paralabrax maculatofasciatus*, tomando en cuenta lo establecido por Balon (2002), nuestros individuos muestreados, están ubicados en el periodo larvario, en sus diferentes fases de vida de cada uno hasta el día 26, alcanzando la formación de la placa hipúrica, así como los elementos de las aletas pares e impares, no obstante Peña-Martínez (2000) menciona que la aparición de las glándulas gástricas en el día 16 DDE, marca la diferencia entre el periodo larval y juvenil de los especímenes con ontogenia indirecta, alcanzando tallas de 26.6 mm de longitud total en especímenes de 30 DDE, cabe mencionar que dicha longitud se obtuvo en individuos de este experimento hasta el día 48, por lo que nuestros individuos alcanzaron morfológicamente la clasificación de juvenil hasta el día 36 de acuerdo a lo establecido por Balon (2002)

Histológicamente, el desarrollo de los órganos en individuos de *Paralabrax maculatofasciatus* sigue el mismo patrón que la mayoría de los demás vertebrados, ya que aparece en los primeros días de vida el estómago aún indiferenciado, esta característica es una de los puntos más importantes en el desarrollo del individuo, así como lo menciona Tatsuya *et al.* (2002) el desarrollo de las partes que conforman el sistema digestivo en los teleósteos va a depender de la estrategia de vida que tenga el pez, sin embargo un desarrollo inicial de éste, es característico de las especies omnívoras, ya que tiene que tener sus requerimientos alimenticios desde la primera alimentación exógena, de igual manera en la cabrilla arenosa se pudo observar histológicamente dichos procesos, posteriormente comienza el desarrollo de los órganos adyacentes al sistema digestivo: páncreas e hígado entre otros (Balinsky, 1978; Romer 1973).

El desarrollo de los diferentes órganos en larvas de *Paralabrax maculatofasciatus* corresponde a lo citado por varios autores, la aparición de las diferentes partes del tubo digestivo, hígado y riñones es similar a la del *Dentex dentex* (Santamaría *et al.*, 2004) y *Sarda orientalis* (Tatsuya *et al.* 2002) sin embargo las tallas a las que alcanza la formación de la mayoría de los órganos es mayor en *Paralabrax maculatofasciatus* que en las especies antes mencionadas.

#### 8.4. Desarrollo de la gónada

De acuerdo a lo observado en los cortes histológicos en especímenes de *Paralabrax maculatofasciatus*, el desarrollo de la gónada es similar a la de los demás vertebrados, Devlin y Nagahama (2002), mencionaron que las células germinales en diferentes especies de peces tanto marinos como de agua dulce, derivan de una capa del tejido mesodérmico, sin embargo a diferencia de peces como los cíclidos, en los cuales la diferenciación de las células germinales puede observarse al los 3 DDE mediante una técnica de Vasa (Nagahama, 1999) ó cíprinidos (Timmermans *et al.*1996) en donde dichas células aparecen antes de la sexta semana (DE) mediante una técnica de anticuerpos monoclonados, el proceso histológico que se llevo acabo con estos organismo solo fue una inclusión en parafina y teñidos con hematoxilina-eosina y tricrómica de mallory , las cuales son técnicas topográficas que demuestran la afinidad de un tejido por los colorantes ácidos ó básicos.

Asimismo en los trabajos realizados por Park *et al.*,(2004) hicieron mención de que las células germinales en *Pseudobagrus fulvidraco* aparecen en ambos lados de los conductos mesonéfricos adjuntas a la capa germinal de la cavidad abdominal, cuando el organismo tiene una talla de 7.8 mm y aunque en la cabrilla arenosa se observó una diferenciación de las células germinales similar a la de esta especie, esta característica se puede observar a una talla menor a 6.9 mm de longitud patrón.

Otro pez en el que, no solo es similar el desarrollo de la gónada si no que también el número de PGCs encontradas en cada uno de los lóbulos de la gónada aún indiferenciada, es la especie de *Danio rerio*, en donde Maack y Segner (2003) reportaron que esta diferenciación se puede observar a los 14 (dde) con una agrupación de 10 a 12 PGCs, sin embargo la aparición de las células germinales en *Paralabrax maculatofasciatus* fue hasta una talla de 11.3 mm, cuando el número de células por cresta germinal es similar, cabe mencionar que en ambas especies las técnicas de procesamiento histológico fueron las mismas, así como la observación al microscopio óptico.

El desarrollo tanto de las células germinales, como de los lóbulos de las gónadas de la especie en estudio, presenta el mismo patrón que en la mayoría de los serránidos, según lo reporta Borquez *et al.* (1988), ya que en su estudio sobre la estructura gonadal de tres especies del género *Paralabrax* menciona el desarrollo de las mismas, otro punto que concuerda con lo mencionado por dicho autor es que el tamaño de los lóbulos izquierdos es mayor a los derechos, en las tres especies, este crecimiento de un lóbulo mas grande que otro también esta presente en cortes histológicos realizados a nuestros especímenes en estudio, esto puede apreciarse solo en los especímenes de tallas que van desde los 10.14 hasta los 40.62 mm, ya que en tallas posteriores los lóbulos fueron seccionados de los individuos, de los cuales solamente se proceso un solo lóbulo.

Una vez que las células germinales son diferenciadas en *Paralabrax maculatofasciatus*, estas a su vez van formando un engrosamiento de tejido mesodérmico para formar cada uno de los lóbulos en donde se desarrollará la gónada, de igual manera que Balinsky (1978) reportó el desarrollo de la gónada, este pudo observarse, a tal grado que se diferencia cada una de las partes de las crestas germinales y como estas quedan suspendidas de la cavidad del mesenterio dorsal por una línea delgada de células germinales, tal y como lo mencionó dicho autor.

Anteriormente se había mencionado la relación del trabajo de Hendry *et al.* (2002) hecha con el *Hippoglossus hippoglossus* y su similitud en la diferenciación y desarrollo de las gónadas, sin embargo estas células aparecen en el organismo a una talla de 50.5 mm, mientras que en *Paralabrax maculatofasciatus* son identificables a una longitud promedio de 37.88 mm. Borquez *et al.* (1988) reportaron 7 estadios de maduración en *Paralabrax humeralis*, los cuales describe brevemente, en el primero de ellos menciona una gónada con aspecto de hilo, poco voluminoso y de coloración rosada, y aunque no menciona a que talla en los especímenes presentan las estructuras con esas características, si hace mención a las estructuras. Esta forma de las estructuras es similar a la encontrada en *Paralabrax maculatofasciatus*, en el presente trabajo se pudo corroborar lo dicho por el anterior autor, en este estudio se obtiene un órgano con características similares a la talla de arriba mencionada, Sin embargo, por la clasificación de la madurez en los oocitos de este trabajo fue tomada de Ocampo-Cervantes (2002), cabe mencionar que con respecto a los siguientes estadios de madurez que el autor maneja, solo se llegó al estadio II conocido como crecimiento primario, de igual manera que Borquez *et al.* (1988), Ocampo-Cervantes no maneja la talla con la que los especímenes fueron clasificados. La fase final a la que se llegó en este trabajo fue para ambas clasificaciones únicamente la de desarrollo primario. Alcanzando un juvenil con 98.5 mm.

Los diferentes estadios de desarrollo de los oocitos en los organismos procesados en este trabajo, concuerdan con lo mencionado por Yamamoto (1969) donde describe los diferentes tipos de gónadas que existen en los teleósteos, así como los tipos de hermafroditismos y sus características. Asimismo Rosales-Velázquez (1997) encontró que *Paralabrax maculatofasciatus* presenta un desove asincrónico, lo cual se demostró histológicamente en este estudio, al observar oocitos en diferentes estados de desarrollo.

La talla máxima alcanzada en este experimento fue de 98.5 mm, sin embargo ya hay presencia de oocitos en crecimiento secundario, siguiendo el desarrollo de la

gónada podríamos corroborar con lo citado por Lluch-Cota (1995), el cual encuentra hembras sexualmente maduras a una talla de 150 mm

Durante el desarrollo de este trabajo, se logro determinar la talla en la que aparecen las células primordiales germinales, así como la migración de las mismas y el desarrollo del tejido gonadal hasta la fase de maduración de crecimiento primario, oocitos perinucleolares, lo cual permitirá estimar los tiempos para establecer protocolos de masculinización para esta especie.

## 9.CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados encontrados en este estudio , se puede concluir los siguientes puntos:

- 1) Durante el periodo larvario se logro determinar la talla a la cual se inicia el desarrollo del tejido mesodérmico (6.37mm), caracterizándose por dos bandas longitudinales a ambos lados del mesenterio dorsal y por un engrosamiento a los extremos del mismo, que forma las crestas germinales. Posteriormente, en la fase de postflexión se detecto la migración de las Células Primordiales Germinales a una talla promedio de 10.14 mm, por un agrupamiento de células germinales en estructuras pareadas debajo de la vejiga gaseosa en la región superior de la cavidad torácica. Durante el desarrollo se observo que las oogonias permanecen indiferenciadas hasta una talla de 61.6 mm y con una edad de 95 DDE observándose solamente un aumento de tamaño, así como del número de células germinales. En el periodo juvenil y a partir de la talla antes mencionada se da una diferenciación de las partes del lóbulo de la gónada (nidos de oogonias, lumen ovárico, teca entre otras) y así permanece hasta el final del experimento.
- 2) El estadio máximo de desarrollo de los oocitos alcanzado durante el periodo de observación es el de crecimiento primario ( oocitos perinucleolares), utilizando el criterio de Ocampo-Cervantes, 2002.

## 10. RECOMENDACIONES

Con base a los resultados del experimento anterior y la experiencia adquirida durante el desarrollo de este trabajo , se puede recomendar los siguientes puntos para trabajos similares en un futuro:

- 1) Se recomienda que el cultivo de *Paralabrax maculatofasciatus* se lleve a cabo durante mas tiempo que en este trabajo, de esta manera se podrían obtener individuos de una talla en la que histológicamente se de la primera maduración sexual en dicho organismo.
- 2) Con respecto a la crianza larvaria es de suma importancia que se cubran todos los requerimientos nutricionales que el organismo necesita con base a lo ya establecido por varios autores para esta especie, así como posibles soluciones en caso de que la fuente principal de alimento se vea mermada.
- 3) En el proceso histológico de las larvas, se recomienda realizar la inclusión en resina, de esta manera los cortes realizados a dichos especimenes no se verán afectados a la hora de los cortes en el micrótopo y su apreciación en el microscopio será mejor.
- 4) De igual manera se recomienda el uso de técnicas histoquímicas como la de Vas, que permitan observar los cambios durante la migración de las PGCs así como su temprana diferenciación.
- 5) Asimismo, si el objetivo del trabajo es observar el desarrollo de las PGCs, se recomienda realizar los cortes histológicos solamente en la región medio-posterior del individuo (incluyendo larvas) en una dirección antero-posterior del cuerpo, de esta manera se minimiza el uso de material histológico y los gastos de la investigación.

- 6) Es recomendable que una vez que el tejido gonádico sea visible mediante una disección sea retirado para ser procesado por separado del resto del organismo, así se apreciara mejor el lóbulo de la gónada y los diferentes tejidos que los componen.

### 10.1 RECOMENDACIONES TÉCNICAS Y DE METODOLOGÍA

- 1) Se logro estandarizar la técnica de inclusión doble para larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*, con un tiempo de exposición al alcohol-cloroformo de 20 min y 10 min en cloroformo.
- 2) Los cortes de larvas sin la doble inclusión, presentaron en su mayoría las estructuras rotas debido al manejo durante el procesamiento, haciendo difícil su observación al microscopio.
- 3) La solución descalcificadora que tuvo mejor resultado fue el EDTA al 5% por aproximadamente 3 días, con recambio constante de dicha solución, de esta manera los cortes se encontraron más enteros en cuanto a su estructura que con el ácido fórmico, esto debido a que el ácido provoca burbujas al hacer contacto con las estructuras que contienen calcio.
- 4) Se concluye también que no es necesario realizar los cortes histológicos de todo el organismo, si no solamente de la parte medio-posterior del mismo, es aquí donde se empieza a diferenciar las PGCs.

## LITERATURA CITADA

- Alvarez-González, C. A. 1999. Optimización del proceso de producción de semilla de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae) en sistemas de circulación cerrada, México. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. 107 p.
- Alvarez-González , C.A., J.L. Ortiz-Galindo, S. Dumas, S.F. Martínez-Díaz, D.E. Hernández-Ceballos, T. Grayeb-Del Alamo, M. Moreno-Legorreta, R. Peña-Martínez & R. Civera-Cerecedo. 2001a. Effect of stocking density on the growth and survival san bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae in a closed recirculating system. J. World Aquac. Soc., 32:130-137.
- Alvarez-González, C. A., R. Civera-Cerecedo, J. L. Ortíz-Galindo, M. Moreno-Legorreta & T. Grayeb-Del Alamo. 2001b. Effect of dietary protein level on growth and body composition of juvenile soptted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* fed practical diets. Aquaculture, 194:151-159.
- Alvarez-González, C. A. 2003. Actividad enzimática digestiva y evaluación de las dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae), Tesis de Doctorado. CICIMAR-IPN, México. 164 p.
- Asoh, K., M. Kasuya. 2002. Gonadal development and mode of sexuality in coral reef damiselfish, *Dascyllus trimaculatus*. J. Zool. Lond., 256:301-309.
- Asoh, K., T. Yoshikawa. 2003. Gonadal development and indication of functional protogyny in the indian damselfish *Dascyllus carneus*. J. Zool. Lond., 260:23-39.

- Balinsky, B.I. 1978. Introducción a la embriología. Ediciones Omega, Barcelona, 664 p.
- Basch, P.F. 1986. An alginate matrix double-embedding method for paraffin sectioning of minute specimens. J. Microtech. Histochem., 61(4):235-238.
- Bieniarz, K. 1986. Sex differentiation and puberty in ciprinids. En Devlin, R., Yoshitaka N. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture, 208:191-364.
- Blázquez, M., F. Piferrer, S. Zanuy, M. Carillo & E. M. Donaldson. 1995. Development of sex control techniques for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) aquaculture: effects of dietary 17 $\alpha$  methyltestosterona prior to sex differentiation. Aquaculture, 135:329-342.
- Borquez, R. A., P.A. Olivares & M.L. Tapia. 1988. Estructura gonadal e inversión sexual de la cabrilla común *Paralabrax humeralis* Valenciennes, 1828 (Pisces:Serranidae). Est. Oceanol., 7:51-58.
- Castello-Orvay, F. 2001. Estado actual del cultivo de peces en el mundo, 07-13. En: 4° curso Interamericano "Cultivo de peces marinos". Universidad Católica del Norte. Coquimbo Chile. 338p.
- Chatain, B., Saillant E. & S. Peruzzi. 1999. Production of monosex male population of European sea bass *Dicentrarchus labrax* by used the syntetic androgen 17  $\alpha$  – methyldehydrotestosterone. Aquaculture, 178:225-234
- Chuaire, L. & M.C. Sánchez. 2002. Células germinativas primordiales femeninas: origen y migración hacia los primordios gonadales. Col. Méd., 33(4):171-178.

- Contreras-Sánchez, W. M. & G. Marquez-Couturier. 2001. Elimination of Methyltestosterone (MT) from Intensive Masculinization System: Use of Activated Charcoal in Concrete Tanks. Univ. J. Autón. Tab., 5p.
- Crespo, S., M. Marín, C.A. Santamaría, R. Sala, A. Grau & E. Pastor. 2001. Histopathological observations during larval rearing of common dentex *Dentex dentex* (Sparidae), Aquaculture, 192:121-132.
- Davenport, M.D. 1960. Histological and histochemical technics. W. B. Saunders company, London.174 p.
- Devlin, H.R. & Y. Nagahama. 2002. Sex determination and sex differentiation in fishes: an overview of genetic, physiological, and environmental Influences. Aquaculture, 208:191-363.
- Ferry L.A., Stephen L., Clarck, Gregor M.C., 1997, Food habits of spotted Sand Bass (*Paralabrax maculatofasciatus*, Serranidae) from Bahía de los Angeles, Baja California, Bull. South. Calif. Acad. Sci., 96(1):1-21
- Fran, S. & S. Junquera. 2003. Protocolos generales para cortes histológicos de ovarios de peces, 1-10. En: Ecología de la reproducción y potencial reproductivo en las poblaciones de peces marinos. Curso doutoramento do bienio 2001-2003. Universidad de Vigo. CSIC Press, España.
- Francis, R.C. 1992. Sexual lability in teleosts: developmental factors. Q. Rev.67:1-18.
- Gale, W.L., M.S. Fitzpatrick, M. Lucero, W.M. Contreras-Sánchez, & C.B. Schreck. 1999. Production of all-male populations of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by immersion in androgens. Aquaculture, 178:349-357.

- García-Gomez, R. E. 2003. Efectos en el crecimiento y la supervivencia de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* en dos tiempos de destete con dietas microparticuladas. Tesis de licenciatura. Univ. Autón. B.C.S. México. 63 p.
- Goto-Kazeto, R., A. Yukiko, K. Masi, E. Yamaha, S. Adachi & K. Yamauchi. 2005. Temperatura-dependent sex differentiation in goldfish : Establishing the temperature-sensitive periodo and effect of constant and fluctuating water temperatures. Aquaculture, 254: 612-624.
- Heemstra, P.C. 1995. Serranide, 1565-1613. En: Fisher, W. F. Krupp ; W. Schneider, C. Sommer, K. E. Carpenter ; V.H. Niem (Eds.) Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico Centro-Oriental. Vol III Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Rome. 1813 p.
- Hendry, C.I., D.J. Martin-Robichaud & T.J. Benfey. 2002. Gonadal sex differentiation in Atlantic halibut, J. Fish Biol., 60:1431-1442.
- Hunter G. A. & E. M. Donaldson. 1983. Hormonal sex control and its application to the fish culture. 223-291 En: Hoar, W.S., D.J. Randall & E.M. Donaldson. Fish Physiology Vol.IX part B. Academic Press, INC. Orlando, Florida. 477 p.
- Ihssen, P.E., Mac Kay, L. R. Mc Millan, y R. B. Philips. 1990. Ploidy manipulation and gynogenesis in fishes. Cytogenetic and fisheries application. Trans. Am. Fish. Soc., 119:689-717.
- Indar, W. Ramnarine. 1994. Larval culture, development and growth of the cascudu, *Hiplosternum littorale*. Aquaculture, 126:291-298.

- Kardong K.V. 1998. Vertebrates Comparative anatomy, function, evolution. Second Edition. Mc Graw-Hill. 747 p.
- Koumoundouros G. M., L. A. Plavidis, C. Kokkari, A. Sterioti, P. Divanach & M. Kentouri. 2002. Temperature sex determination in the European Sea Bass, *Dicentrarchus labrax* (Teleostei, Perciforme, Moronidae): Critical sensitive Ontogenic Phase. J. Exp. Zool. 292:573-579.
- Lee C., C. S. Tamaru & C.D. Kelly . 1986. Technique for making chronic-release LHRH-a and 17 $\alpha$  methyltestosterona pellets for intramuscular implantation in fishes. Aquaculture, 59:161-168.
- Lim B.S., H. Kagawa, K. Gen & K. Okuzawa. 2003. Effects of water temperature on the gonadal development and expression of steroidogenic enzymes in the gonad of juvenile red seabream *Pagrus major*. Fish Physiol. Biochem. 28:161-162.
- Lluch-Cota, D. B. 1995. Aspectos reproductivos de la Cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Pisces: Serranidae) en Bahía Magdalena-Almejas, Baja California Sur. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. La Paz, México. 116 p.
- Luckenbach, L. Adam, J. Godwin, H.V. Daniela & R. J. Borski. 2003. Gonadal differentiation and effects of temperature on sex determination in southern flounder ( *Paralichthys lethostigma*). Aquaculture, 216: 315-327.
- Luna, L. 1968. Manual of histologic staining method of the armed forces institute of pathology. Mc Graw Hill Book Co. 3<sup>rd</sup> edition. 258 p.
- Maack G. & H. Segner. 2003. Morphological development of gonads in zebrafish. J. Fish Biol. 62:895-906.

- Marañón-Herrera, S., E. Maya-Peña & H. Salgado-Zamora. 1999. Masculinización de *Xiphophorus helleri* (Pisces: Poeciliidae) inducida por los esteroides norgestel y androstenediona. Hidrobiológica, 9:31-38.
- Marañón-Herrera, S. & E. Maya-Peña. 2001. Efecto de la temperatura sobre la proporción sexual de *Poecilia reticulata* Peters, 1859( Pisces: Poeciliidae). Hidrobiológica, 11(2):157-162.
- Nelson, J.S. 1994. Fishes of the world. Ed. John Wiley & Sons, Inc. Tercera edición. 600 p.
- Ocampo-Cervantes, J. A. 2002. Desarrollo gonádico y actividad reproductiva de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Teleostei: Serranidae) en la Bahía de La Paz, Baja California Sur. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN. México. 78 p.
- Oda, D.L., R.J. Lavenvergi & J.M. Rounds. 1993. Reproductive biology of three californian species of paralabrax (Pisces: Serranide). Calif. Coop. Ocean. Fish Invest. Rep., 34:122-132.
- Pandian, T.J.,& S.G. Sheela. 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish. Aquaculture, 138:1-22.
- Park, I., Jung-Hye K., Sung H. Ch. & Dong S.K. 2004. Sex differentiation and hormonal sex reversal in the bagrid catfish *Pseudobagrus fulvidraco* (Richardson). Aquaculture, 232:183-193
- Pavlidis, M., G. Koumoundourous A. Sterioti, S. Somarakis, P. Divanach & M. Kentouri. 2000. Evidence of temperature-dependent sex determination in the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) J. Exp. Zool., 287: 225-232.

- Pawson, M.G., G.D. Pickett & P.R. Withames. 2000. The influence of temperature on the onset of first maturity in sea bass. J. Fish Biol. 56:319-327.
- Price, D. 1989. Genetics of sex determination in fishes, 78-89. En: Potts G. R., R. J. Woottom (Eds.) Fish reproduction strategies and tactics, Academic Press, San Diego C.A.
- Romer, A. S. 1973. Anatomía comparada de vertebrados, cuarta edición, Ed. Interamericana, 430 p.
- Rosales-Velázquez, M.O. 1997. Efecto de la alimentación sobre los desoves de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Teleostei: Serranidae) mantenida en cautiverio. Tesis de maestría. CICIMAR-IPN. México. 62 p.
- Saillant, E., A. Foster, P. Haffry, B. Menu, J. Thimoier & B. Chatain. 2002. Temperature effects and genotype-temperature interactions on sex determination in the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. J. Exp. Zool., 292:494-505.
- Santamaría, C.A., M. Marin de Mateo, R. Traveset, R. Sala, A. Grau, E. Pastor, C. Sarasquete & S. Crespo. 2004. Larval organogenesis in common dentex *Dentex dentex* (Sparidae): histological and histochemical aspects. Aquaculture, 273:207-228.
- Satoh, N. & N. Egami. 1972. Sex differentiation of germ cells in the teleost, *Oryzias latipes*, during normal embryonic development. J. Embriol. Morphol., 28(2):385-395.
- Shapiro, D. Y. 1992. Plasticity of gonadal development and protandry in fish, J. Exp Zool., 261:194-203.

- Strickland, J. D. H. & Parsons T. R. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada. 309 p.
- Strüssmann, C. A., S. Moriyama, E. F. Hanke, J. C. Calsina & F. Takashima. 1995. Evidence of thermolabile sex determination in pejerrey. J. Fish Biol., 48:643-651.
- Suquet, M., Y. Normant, J.L. Gaignon, L. Quémener & C. Fauvel. 2005. Effect of water temperature on individual reproductive activity of pollack (*Pollachius pollachius*). Aquaculture, 243:113-120.
- Takashima, F., Patino R. & M. Nombra. 1980. Histological studies on the sex differentiation in rainbow trout. Bull. Jpn Soc. Sci. Fish., 46 (11):1317-1322.
- Tapia-Vázquez, O. 1984. Manual de técnicas histológicas. Secretaría de pesca. Primera edición. México. 32p.
- Tatsuya, K., M. Kodama, H. Arai, M. Tagawa & M. Tanaka. 2002. Precocious development of the digestive system in relation to early appearance of piscivory in striped bonito *Sarda orientalis* larvae. Fish. Sci., 68:1212-1218.
- Timmermans, L. P. M. 1987. Early development and differentiation in fish. Sarsia, 72:331-339.
- Timmermans, L. P. M., J. Wang, N.Taverne, H. Schipper & K. Permentier. 1996. Characterization of antigens specific for spermatozoa and germ cells during early gonadal development of carp (*Cyprinus carpio*, Cyprinidae, Teleostei) with monoclonal antibodies. J. Dev. Biol. 1:221-222.
- Tucker, J. W. 1998. Spawning by captive serranid fishes. J. World Aquac. Soc., 25:345-359.

- Van Aerle, R., T.J. Runnalls & C.R. Tyler. 2004. Ontogeny of gonadal sex development relative to growth in fathead minnow J. Fish Biol., 64:355-369.
- Yamamoto, T. 1969. Sex differentiation, 117-175. En Hoar, W., Randall, D. (Eds.) Fish Physiology, Vol. III: Reproduction and Growth. Academic Press, New York. 485 p.
- Yoshikawa, H. & M. Oguri. 1978. Sex differentiation in a cichlid *Tilapia zillii*, Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 44 (4):313-318.
- Yoshitaka, N. 1983. The functional morphology of teleost gonads, 223-264. En: Hoar, W.S., D.J. Randall & E. M. Donaldson. Fish Physiology Vol.IX part A Endocrine tissues and hormones. Academic Press, INC. Orlando, Florida. 483 p.
- Zanuy, S., F. Prat, M. Carillo & N. R. Bromage. 1995. Effects of constant photoperiod on spawning and plasma 17 $\beta$ -estradiol levels of sea bass *Dicentrarchus labrax*. Inst. Acuicultura Torre de la Sal. Castellón. España. 147-152 p.
- Zanuy, S., M. Carillo, A. Felip, L. Rodriguez, M. Blázquez, J. Ramos & F. Piferrer. 2001. Genetic hormonal and environmental approaches for the control of reproduction in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture, 202:187-203.