

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Programa de Posgrado en Ciencias
en Acuicultura**

**Descripción del desarrollo esquelético de *Totoaba
macdonaldi*, caracterización de sus malformaciones y su
efecto en el desempeño biológico**

Tesis
Para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias
Presenta:

Omar García Concha

Ensenada, Baja California, México
2016

Tesis defendida por
Omar García Concha
y aprobada por el siguiente comité

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Director de tesis

Dra. Mónica Hernández Rodríguez

M. en C. Vicente Ferreira Bartrina



Dr. Benjamín Barón Sevilla
Coordinador del postgrado en
Ciencias en Acuicultura

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de estudios de postgrado

Omar García concha ©2016

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis

Resumen de la tesis que presenta **Omar García Concha** como requisito parcial para la obtención del grado de maestro en ciencias en acuicultura

Descripción del desarrollo esquelético de *Totoaba macdonaldi*, caracterización de sus malformaciones y su efecto en el desempeño biológico

Resumen aprobado por:

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Director de tesis

La totoaba, *Totoaba macdonaldi* es un pez endémico del Golfo de California que se encuentra en peligro por la sobrepesca, desde 1987 está protegido por la legislación mexicana. Actualmente se cultiva con fines de repoblación y para el consumo humano. A pesar de que se dispone de los protocolos para la reproducción y el cultivo larval, la sobrevivencia de las larvas y la producción de juveniles son variables. Uno de los problemas comúnmente asociados a los peces marinos cultivados, incluida la totoaba, es el desarrollo de malformaciones óseas, que son ocasionadas por distintos factores y tienen un efecto negativo en el aspecto y en el desempeño biológico de los peces afectados. El conocimiento del desarrollo óseo, es fundamental para el estudio de las malformaciones del esqueleto de los peces y de las condiciones que favorecen su desarrollo. En esta tesis se estudió la prevalencia de deformidades en tres grupos de totoaba cultivados en forma independiente con un protocolo común. Se cuantificó una prevalencia promedio de $21.1 \pm 3.3\%$, y se identificaron ocho tipos de deformidades asociadas al esqueleto axial, apendicular y craneo facial. Las malformaciones operculares fueron las más importantes ya que se presentaron en el 95.2% de los organismos deformes. Durante el desarrollo larval, el primer evento de malformación se observó en la notocorda, antes de que la larva consumiera las reservas del saco vitelino, seguido de las malformaciones operculares identificadas durante la etapa de flexión de la notocorda, a los 17 DDE. La técnica de transparentación y tinción diferencial del cartílago y hueso, es una herramienta útil para la identificación de las malformaciones operculares y de la columna vertebral. Las pruebas de desempeño biológico (crecimiento, hematocrito y conteo de eritrocitos) no mostraron diferencias entre los organismos con deformación opercular y los sanos. Se observaron diferencias entre el metabolismo activo de los organismos con malformación opercular bilateral y los organismos sanos.

Palabras clave: **Totoaba, malformaciones, esqueleto, opérculos.**

Abstract of the tesis presented by **Omar García Concha** as a partial requirement to obtain the Master of Science Degree in Aquaculture.

Description of the skeletal development of *Totoaba macdonaldi*, characterization of their malformations and the effect on the biological performance.

Approved by:

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Director de tesis

Totoaba, *Totoaba macdonaldi*, is an endemic fish of the Gulf of California that was threatened by overfishing, from 1987 is protected by Mexican law. Currently, the totoaba is cultivated for restocking and for human consumption. Although protocols are available for reproduction and larval culture, the survival of larvae and juvenile production is variable. One of the problems commonly associated with cultivated marine fishes, including totoaba, is the development of bone malformations that are caused by various factors and have a negative effect on the appearance and the biological performance of the affected fish. Knowledge of skeletal development is fundamental to the study of fish malformations and the conditions that cause their development. In this thesis the prevalence of deformities was studied in three totoaba groups cultured independently, with a common protocol. The average of deformities prevalence was $21.1 \pm 3.3\%$ and were identified eight types, associated with the craniofacial, axial and appendicular skeleton. The opercular malformations were the most important since they occurred in 95.2% of the deformed fishes. During larval development, the first event of deformation was observed in the notochord, before the larvae consume the yolk sac reserves, followed by the opercular defects identified during the notochord flexion stage, when larvae have 17 days after hatch. The transparent technique and differential staining of cartilage and bone, is a useful tool for identification of opercular malformations and spinal column. Biological performance tests (growth, hematocrit and red blood cells count) were not different between healthy fish and those with opercular deformation. Differences between active metabolism of totoabas with bilateral opercular malformation and healthy totoabas were observed.

Keywords: **Totoaba, malformations, skeleton, opercular.**

Dedicatoria

A Guille y Elisa mi madre y hermana por estar siempre a mi lado apoyándome, ayudarme a ser mejor persona, a mi sobrino Javier Omar por ser un nuevo motivo de superación y a mi tía Gloria por transmitirme el amor a la naturaleza desde pequeño.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico para la realización de esta tesis.

Al Doctor Benjamín Barón Sevilla mi director de tesis quien me ha apoyado desde las prácticas profesionales en el 2010 y ahora en la tesis de maestría, estoy muy agradecido por la oportunidad de realizar mis sueños en el trabajo de la acuicultura.

A los miembros de mi comité de tesis, Dra. Mónica Hernández Rodríguez y M. en C. Vicente Ferreira Bartrina por su apoyo y observaciones para mejorar esta tesis.

Al Ing. Germán Emilio Ibarra García parra, Director Técnico del Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora y al Ing. Jorge Noé Trujillo Villalba, Técnico del Centro Reprodutor de Especies Marinas del Estado de Sonora, por el donativo de los huevos de totoaba.

A la Biol. Uvinai Salgado, técnico del Laboratorio de Cultivo de Peces Marinos del CICESE, por la ayuda en la producción de alimento vivo y por su apoyo durante los experimentos, y en especial por su disponibilidad y profesionalismo.

A la M. en C. Yanet Guerrero Rentería, técnico del Laboratorio de Biología y Patología de organismos acuáticos del CICESE, por su colaboración en la estandarización del protocolo de transparentación y diafanización de larvas de los peces. También por el entrenamiento técnico en la inclusión de muestras histológicas, así como también por el procesado de muestras y la elaboración de laminillas histológicas.

Al Dr. David Alberto Rivas Camargo por su gran disponibilidad en la asesoría para procesamiento de los datos de metabolismo.

A la Dra. Beatriz Cordero Esquivel por su disponibilidad en el proceso de admisión al postgrado y su atención para cualquier trámite.

A Alex que siempre ha confiado en mí y ha sido un motivo de superación.

A mis compañeros y amigos de generación Noemí Cota Mamani, Laura Rangel, Jonathan Pinto quienes me brindaron siempre su apoyo e hicieron más feliz mi estancia.

Al equipo de atletismo del CICESE y en especial al entrenador Humberto Delgadillo por sus consejos y siempre impulsarnos a tener una buena actitud ante la vida.

Tabla de contenido

Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xiv
Capítulo I.- Introducción.....	1
1.1 Malformaciones óseas.....	2
1.2 Respiración en peces.....	6
1.3 Metabolismo.....	8
1.4 Hematología en peces.....	9
1.5 Hipótesis.....	9
1.6 Objetivo General.....	9
1.7 Objetivos particulares.....	9
Capítulo 2. Materiales y métodos.....	11
2.1 Fase A. Diagnóstico	11
2.2 Técnica de tinción y transparentación.....	13
2.3 Fase B: Pruebas de desempeño biológico.....	16
2.3.1 Crecimiento.....	16
2.3.2 Pruebas de metabolismo activo.....	19
2.3.3 Parámetros hematológicos.....	21
2.4 Análisis estadístico.....	23

Capítulo 3.-Resultados	24
3.1 Fase A. Diagnóstico.....	24
3.1.1 Técnica de transparentación y doble tinción.....	25
3.1.2 Desarrollo óseo de <i>Totoaba macdonaldi</i>	29
3.1.3 Malformaciones durante el cultivo larval y anomalías detectadas	39
3.1.3.1 Malformaciones del notocordio.....	39
3.1.3.2 Malformaciones de la columna y anomalías del desarrollo de la vejiga gaseosa.....	40
3.1.3.3 Malformaciones operculares.....	41
3.1.4 Malformaciones en la etapa juvenil temprana.	43
3.2 Fase B:Desempeño biológico.....	47
3.2.1 Cultivo de juveniles.....	47
3.2.1.1 Malformaciones desarrolladas durante el cultivo.....	49
3.2.1.2 Recuperación opercular.....	53
3.2.2 Metabolismo activo.....	54
3.2.3 Concentración de eritrocitos y hematocrito (Ht).....	57
 Capítulo 4 Discusión	59
4.1 Fase A: Diagnóstico.....	59
4.1.1 Cultivo larval.....	59
4.1.2 Esqueletogénesis.....	60
4.1.3 Anomalías del desarrollo.	61
4.1.3.1 Malformaciones del notocordio.....	62
4.1.3.2 Inflado de la vejiga natatoria.....	64

4.1.3.3.-Malformaciones de la columna.....	65
4.1.3.4 Malformaciones operculares.....	66
4.1.3.5 Prevalencia de malformaciones en juveniles.....	69
4.2 Fase B.-Desempeño biológico.....	70
4.2.1 Cultivo de juveniles deformes y sanos.....	70
4.2.1.1 Crecimiento.....	70
4.2.1.2 Malformaciones de la columna vertebral.....	71
4.2.1.3 Remodelación de opérculos.....	71
4.2.2 Metabolismo activo.....	72
4.2.3 Análisis de sangre.....	74
Capítulo 5 Conclusiones.....	76
Recomendaciones.....	77
Lista de referencias bibliográficas.....	80

Lista de figuras

Figura	Página
1	Juvenil de <i>Totoaba macdonaldi</i> cultivado en el laboratorio de peces marinos del CICESE..... 1
2	Proceso de respiración de los peces. Modificado de Helfman <i>et al.</i> (2009)..... 7
3	Proceso de tinción y transparentación de larvas de totoaba. a) Organismo fijado y deshidratado b) Organismo después de la tinción con azul de alcian y blanqueamiento, c) Organismo después del macerado con la solución de tripsina y bórax d) Organismos después de la tinción con rojo de alizarina y lavado con la solución de hidróxido de potasio..... 16
4	Sistema de recirculación para cultivo de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> . Tc- tanque de cultivo o unidad experimental, Ba- Bomba de agua, Ei- equipos de intercambio de calor, Ai- Suministro de aireación, Tc- Tanque de compensación, Ea- entrada de agua tratada a las unidades experimentales, Fi- Filtros mecánico biológicos..... 18
5	Medición de metabolismo activo de juveniles de totoaba a) Organismo con MOB anestesiado b) Organismo en el túnel de nado durante medición, c) Diagrama del canal de nado utilizado para la medición del metabolismo activo, B1- Bomba uno, B2- Bomba dos, Pf- Placa para mantener el fluido laminar, P- procesador de señales de electrodos..... 21
6	Crecimiento de las larvas de totoaba bajo un protocolo de cultivo estándar..... 24
7	Sistema esquelético de <i>Totoaba macdonaldi</i> , principales partes del esqueleto axial y apendicular a) Esqueleto completo de juvenil de 25 DDE, b) Cabeza, c) Aleta dorsal y d) Aleta anal. Ca- Cabeza, Pp- Parapofisis, Ad- Aleta dorsal, Ac- Aleta caudal, Ape- Aleta pélvica, Aa- Aleta anal, Cve- Costilla ventral, Ba- Basipterigio, Ph- Placa hipural, Cv- Columna vertebral, Cve-Costillas ventrales, Ep- Epurales, , Nc- Neurocraneo, Oj- Ojo, Ms- Mandíbula superior, Mi- Mandíbula inferior, Rb- Rayos branquiostegos, So- Sub opérculo, Op- Opérculo, Pd- Predorsales, Pt- Pterigioforo, Le- Lepidotriquia. 30

8	Cabeza de larva de 5 DDE. He- cartílago etmoidal, Ab- arcos branquiales, Cm- Cartílago de Meckel.....	31
9	Parte anterior del notocordio de larva de 6 DDE. En- Espinas neurales, Mi- Miómeros, No- Notocordio.....	31
10	Larva de 8 DDE a) Cabeza Cs- mandíbula superior, En- Espinas neurales (3) Co- Coracoide y b) Región posterior del notocordio Eh- espinas hemales, H- Hipurales	32
11	Cabeza de larva de 10 DDE.	33
12	Larva de 10 DDE, proceso de osificación de las espinas neurales.....	33
13	Larva de 12 DDE. Izquierda-Vista dorsal de cabeza, Derecha-Aleta caudal. Op- Opérculo, Ms-Mandíbula superior, Ap-Aleta pectoral, Cv- Columna vertebral, En- Espina neural, Eh- hemal, Ur- Urostilo, Ep- Epurales.	34
14	Aleta caudal de organismos de 17 DDE. H1-H5: hipurales, b: Parhipural, u: urostilo, Ep- epurales.....	35
15	Desarrollo esquelético de <i>Totoaba macdonaldi</i> , la barra gris equivale a 1mm.....	37
16	Incubadora con larvas de <i>Totoaba macdonaldi</i> congregadas en las paredes del tanque.....	40
17	Huevos y larvas recién eclosionadas de <i>Totoaba macdonaldi</i> , con malformaciones de la notocorda. La barra equivale a 500µm.....	41
18	Organismo de 29 DDE sano (b) y con malformación de la columna (c) antes (a, b) y después (c, d) de la técnica de transparentación, las llaves indican cifosis.....	42
19	Organismos de 33 DDE sanos y con malformación opercular antes y después del proceso de transparentación y tinción. a) Organismo con malformación opercular, b) organismos sano) organismos sanos, d) exposición de branquias, e) aleta pectoral, f) opérculo sano, g) opérculo deforme.....	43
20	Larva de <i>Totoaba macdonaldi</i> de 19 DDE con malformación opercular monolateral y opérculos osificados.	44
21	Distintas morfologías de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> producidos en el laboratorio de peces marinos del CICESE. a) Malformación de la vejiga natatoria (2015), b) organismo normal, c) malformación del dorso o “saddleback-like syndrom” (año 2a), d)	

	cuerpo acortado (2016-1), e) malformación de la mandíbula inferior, opérculos y columna (2015),f) malformación del cráneo, g) malformación opercular (2016-2)	45
22	Juveniles de 35 DDE después de la técnica de transparentación y doble tinción (2016-2), a) organismos con fusión vertebral (cuerpo corto), b) organismo sano, c) columna vertebral con fusión vertebral y malformación de las espinas hemales y neurales.....	46
23	Prevalencia de malformaciones óseas en juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> cultivados. Izquierda, prevalencia de malformaciones óseas en tres lotes de juveniles. Derecha, proporción de malformaciones por categoría en cada lote de juveniles. MOM-malformación opercular mono lateral, MOB-Malformación opercular bilateral, DM-Deformación de mandíbula, DV-deformación de vejiga gaseosa, CC- cuerpo corto, DD-Deformación de aleta dorsal, DRB-deformación de rayos branquiostegos.	47
24	Crecimiento de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> sanos y deformes (MOM, malformación opercular monolateral y MOB, malformación opercular bilateral), durante los dos meses de cultivo.	49
25	Deformación de mandíbula inferior de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> . a) Desviación en el plano horizontal, b) desviación en el plano vertical.....	51
26	Radiografía de un organismo sano (izquierda.) y de un organismo con deformación de la columna vertebral (lordosis) (derecha) en- espina neural, eh- espina hemal, Vn- Vejiga natatoria, *-vertebras.....	52
27	Radiografías de juveniles de totoaba con diferentes malformaciones. Derecha, deformación opercular mono lateral, cifosis y desviación del eje horizontal de la mandíbula inferior. Izquierda, organismo con deformación opercular mono lateral, cifosis y desviación de la mandíbula inferior en el plano vertical, las llaves indican las regiones de la columna con deformación; cv, compresión vertebral.	53
28	Vertebras normales (arriba) y compresión vertebral (abajo) y deformación de espinas neurales y hemales, la flecha indica el espacio intervertebral.....	54

29	Organismos juveniles con opérculos en diferentes condiciones a,b.-opérculos deformes, c,d.-opérculos en proceso de recuperación, e,f.-opérculos recuperados con superficie rugosa, g,h.-opérculos de organismos normales.....	55
30	Metabolismo activo promedio por condición a) organismos sanos, b) organismos con deformación opercular monolateral, c) organismos con deformación opercular bilateral.	56
31	Diagrama de cajas y bigotes resultantes del análisis de Tukey entre las tasas de consumo de oxígeno de juveniles de totoaba con malformaciones y sanos.....	58
32	Parámetros sanguíneos de <i>Totoaba macdonaldi</i> , a) concentración de eritrocitos, b) hematocrito.	59
33	Larva de <i>Totoaba macdonaldi</i> de 5DDE con el primordio de la vejiga gaseosa.....	65
34	Larva de <i>Totoaba macdonaldi</i> parasitada con <i>Amyloodinium sp.</i> , las flechas negras indican la ubicación de algunos parásitos.....	69

Lista de tablas

Tabla	Página
1 Malformaciones observadas en peces marinos cultivados, su prevalencia y edad de desarrollo, en algunos casos se incluye la posible causa de la malformación.....	5
2 Tiempo de exposición (horas) de los especímenes de distintas edades a los diferentes procesos de la técnica de transparentación y doble tinción.	15
3 Diseño experimental para el estudio del crecimiento de organismos con malformaciones operculares y sanos. MOM (Malformación opercular monolateral), MOB (Malformación opercular bilateral), Sanos (Organismos con ambos opérculos y sin malformación).	17
4 Desarrollo larvario de <i>Totoaba macdonaldi</i> y sus principales cambios morfológicos.....	26
5 Resumen del proceso de desarrollo y osificación de las diferentes piezas óseas durante el desarrollo larval de <i>Totoaba macdonaldi</i> . Ca-cartílago, CH- transición de cartílago a hueso, PO-Proceso de osificación, X- piezas completas, *-pieza ausente.....	38
6 Parámetros fisicoquímicos promedio de cada condición registrada durante el cultivo de organismos sanos, con deformación opercular mono lateral (MOM) y malformación opercular bilateral (MOB).	48
7 Parámetros de crecimiento de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i>	50
8 Tasa metabólica en condiciones de nado activo de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> , sanos, con malformación opercular monolateral (MOM) y bilateral (MOB).....	57

Capítulo I.- Introducción

Totoaba macdonaldi (Figura 1) es un pez endémico del Golfo de California, es la especie de mayor tamaño de la familia *Sciaenidae*, puede alcanzar un peso de 100 kg y una longitud total de 1.98 metros, además de ser un pez muy longevo, ya que se han encontrado organismos de hasta 25 años de edad. En su hábitat natural, los adultos realizan migraciones estacionales durante el invierno, hacia el norte del Golfo de California, al Delta del río Colorado, donde desovan entre los meses de febrero y junio, con la mayor cantidad de desoves en el mes de marzo (Nakashima, 1916; Román-Rodríguez, 1990; Cisneros-Mata *et al.*, 1995).



Figura 1.-Juvenil de *Totoaba macdonaldi* cultivado en el laboratorio de peces marinos del CICESE

La sobrepesca de *T. macdonaldi* ocasionó una importante reducción de las capturas, lo que llevó al gobierno mexicano a proteger a la especie en 1987, cuando se prohibió la pesca en México. En 1976 fue incluida en la lista de especies amenazadas de la convención sobre el comercio internacional de especies en peligro de extinción (CITES), aunque estas medidas no pudieron limitar la pesca incidental asociada a la pesca de camarón (Cisneros-Mata *et al.*, 1995).

Subsecuentemente se han realizado importantes esfuerzos para la repoblación de esta especie mediante su reproducción en cautiverio y liberación en el Golfo de California. La Universidad Autónoma de Baja California, en México, ha logrado la maduración y reproducción de *T. macdonaldi*, sin embargo el proceso de cultivo larvario sigue aún en desarrollo, ya que se han obtenido resultados variables por múltiples factores. (Galaviz *et al.*, 2013). Recientemente, a partir del año 2012, el Instituto de

Acuicultura del Estado de Sonora inició un programa de reproducción, repoblamiento y cultivo comercial de totoaba en Bahía Kino, con resultados satisfactorios.

1.1 Malformaciones óseas

Las malformaciones óseas en peces marinos cultivados son un problema común en la acuicultura de peces marinos, ya que limitan la producción de organismos de buena calidad y tienen un impacto negativo en el valor del producto (Cobcroft y Battaglione, 2009; Georgakopoulou *et al.*, 2010). Algunas malformaciones, como las del cráneo, tienen un impacto negativo en el crecimiento, supervivencia y susceptibilidad a enfermedades, ya que influyen en forma negativa en la capacidad respiratoria, de alimentación y en la formación de los órganos de los sentidos (Koumoundouros *et al.*, 1997; Koumoundouros 2010).

Aunque a menudo los peces deformes son removidos manualmente, la prevalencia e intensidad de las malformaciones pueden ser tan importantes que tienen una repercusión económica en el cultivo de estos organismos, por esta razón es necesaria la comprensión del origen y magnitud del problema, para plantear posibles soluciones (Andrades *et al.*, 1996; Koumoundouros, 2010).

Koumoundouros (1997) hizo una recopilación de las malformaciones más comunes en los peces marinos cultivados y observó que algunas pueden estar asociadas con el desarrollo anormal de la vejiga natatoria, con el desarrollo del esqueleto y las aletas, con una pigmentación anormal, con el patrón anormal de distribución de escamas, y con la forma de cuerpo. Entre las malformaciones más comunes del esqueleto, se encuentran las desviaciones de la columna vertebral (lordosis, escoliosis, y cifosis) y las del cráneo, que incluyen la formación anormal de las mandíbulas o del arco hioideo y/o la ausencia o deformación de algún segmento de los opérculos.

Algunas malformaciones anatómicas se relacionan entre sí, e.g., el inflado anormal de la vejiga natatoria, por lo regular propicia una deformación de la columna y la ausencia de la aleta dorsal, y como consecuencia de estas anomalías de la columna, también se produce una alteración del patrón de distribución de las escamas (Koumoundouros, 2010).

Las malformaciones que involucran la ausencia o reducción de los opérculos, son especialmente importantes debido a que estos huesos craneales tienen una función vital en la respiración y el consumo de alimento, por lo que también podrían tener un efecto negativo sobre el crecimiento, la supervivencia y la susceptibilidad a enfermedades (Koumoundouros, 2010). Las posibles causas del desarrollo anormal de los opérculos se han atribuido a la deficiencia de ciertos ácidos grasos como DHA y EPA (Gapasin and Duray, 2001) y a la temperatura (Abdel *et al.*, 2004; Georgakopoulou *et al.*, 2010) entre otros.

Existen amplias revisiones en las que se estudia el origen y desarrollo de las malformaciones más comunes, así como su prevalencia (Cahu *et al.*, 2003; Koumoundouros, 2010; Boglione *et al.*, 2013a; Boglione *et al.*, 2013b). Las malformaciones tienen un origen multifactorial y son especie específicas.

En *T. macdonaldi*, se han realizado diversos estudios, principalmente enfocados en el desarrollo de su tracto digestivo (Rueda-López *et al.*, 2011; Minjarez-Osorio *et al.*, 2012; Galaviz *et al.*, 2013; Galaviz *et al.*, 2015) y nutrición (Bañuelos-Vargas *et al.*, 2014). Sin embargo el desarrollo óseo de esta especie no se ha estudiado, la única información relacionada con sus malformaciones esqueléticas hace referencia a una prevalencia del 10 al 30% en organismos juveniles, entre las que se destacan las malformaciones operculares y de la columna vertebral (True, 2012). En las totoabas cultivadas en los laboratorios que actualmente se dedican a la producción de juveniles para diferentes propósitos (re poblamiento, cultivo comercial e investigación), como el laboratorio de peces marinos del Centro de Investigaciones Científicas y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) , la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) y el Centro Reproductor de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES), se han

observado malformaciones esqueléticas, especialmente malformaciones craneales, sin embargo, se desconoce con exactitud su prevalencia e intensidad, los factores que influyen en su incidencia y el impacto que tienen sobre el desempeño biológico de los organismos afectados.

En el cultivo de otras especies de peces ya se ha estudiado la prevalencia de malformaciones en general y de las más comunes, además de algunos factores que influyen en la ocurrencia de ciertas malformaciones óseas (Tabla 1).

De los estudios que se presentan en la tabla 1, destaca que la prevalencia de las malformaciones tiene una gran variación entre las especies (3 a 95%) e incluso, para organismos de la misma especie. Las malformaciones observadas varían entre sistemas de cultivo para una misma especie, como en el caso de *Sparus aurata* (Koumoundouros, 1997; Gapasin and Duray, 2001). Esta variación confirma su origen multifactorial, además, en muchas especies el agente causal se desconoce.

En este sentido, como primera instancia para prevenir el desarrollo de malformaciones en los peces marinos cultivados, es necesario estudiar las malformaciones más comunes y su proceso de formación, así como también es importante conocer sus efectos sobre el desempeño de los organismos enfermos.

Tabla 1.- Malformaciones observadas en peces marinos cultivados, su prevalencia y edad de desarrollo, en algunos casos se incluye la posible causa de la malformación.

Especie	Prevalencia	Malformación más común	Edad de detección (dde)	Factor asociado	Referencia
SPARUS AURATA		Opérculos 15.5%	100	-	(Koumoundouros, 1997)
CHANOS CHANOS	3-26%	Rayos branquiostegos y opérculos	22-35	-	(Hilomen-Garcia, 1997)
SPARUS AURATA		Opercular 9.8-17% (principalmente monolateral)	17	-	(Galeotti <i>et al.</i> , 1999)
CHANOS CHANOS	-	6.8-32.4% opercular	60	Concentración de DHA en la dieta	(Gapasin and Duray, 2001)
SPARUS AURATA	-	Opercular 28.5% (principalmente monolateral)	40	-	(Verhaegen <i>et al.</i> , 2007)
LATRIX LINEATA	64±9%	mandibulares	38	Color del tanque	(Cobcroft and Battaglione, 2009)
DICENTRARCHUS LABRAX		Rayos branquiostegos 4.0-33.4%	54-63	Temperatura	(Georgakopoul <i>et al.</i> , 2010)
SERIOLA LALANDI	10-70%	Mandibulares		-	(Cobcroft and Battaglione, 2013)
LATRIX LINEATA	10-95%	-		-	(Cobcroft and Battaglione, 2013)
TRACHINOTUS OVATUS	-	deformación de mandíbula 36.4%	26DDE	-	(Ma <i>et al.</i> , 2016)

En cuanto al efecto que tienen las malformaciones óseas sobre el desempeño biológico de los peces cultivados, se ha evaluado su efecto sobre la velocidad crítica de natación y la forma en que afectan la capacidad natatoria y estado de salud en peces, por lo que son útiles para explicar el impacto ecológico de los procesos de repoblamiento, ya que disminuyen la capacidad de nado puede afectar la supervivencia en el medio silvestre (Plaut, 2001; Lijalad and Powell, 2009a). En este sentido, son pocos los trabajos que han abordado este tema, entre los que se pueden mencionar a Basaran *et al.* (2007) quienes encontraron que la velocidad crítica de natación fue significativamente más alta en juveniles de *Dicentrarchus labrax* sanos que en aquellos con malformaciones mandibulares. Por su parte Lijalad and Powell (2009b) estudiaron la velocidad crítica de

nado en el salmón del Atlántico y también observaron un efecto negativo de las malformaciones mandibulares, aunque no encontraron diferencias en el metabolismo de rutina y máximo entre peces deformes y sanos.

1.2 Respiración en peces

Se ha mencionado que las malformaciones operculares pueden tener un impacto negativo en el proceso de intercambio de gases, ya que los opérculos forman parte de la cámara opercular que en conjunto con la cámara bucal hacen posible el proceso de ventilación de las branquias.

La mayoría de los peces bombean agua para irrigar las branquias, mediante la expansión y contracción de la cámara bucal ubicada en la parte anterior de la cabeza y la cámara opercular situada en la parte posterior, detrás de las branquias (Helfman *et al.*, 2009).

En la primera fase, de ventilación (Figura 2a), se abre la boca y el agua ingresa a la cámara bucal, mientras que la cámara opercular permanece cerrada gracias a los opérculos; la segunda fase consiste en el cierre de la boca y contracción de la cámara bucal (Figura 2b), que impulsa el agua a la cámara opercular a través de las branquias y sale por los opérculos, de esta manera el flujo de agua ocurre en dirección anteroposterior de la cabeza (Figura 2b), provocando un flujo en contra del flujo sanguíneo que circula a través de las branquias, debido a esto, la transferencia de gases por las branquias solo funciona de manera eficiente si el flujo de agua se mantiene en la misma dirección anteroposterior. La ventilación ram es otra forma de provocar el flujo de agua a través de las branquias. Esta forma de ventilación es utilizada por los peces de natación rápida, como los atunes o sardinias, que mantienen la boca abierta y el agua pasa dinámicamente a través de la boca y las branquias (Helfman *et al.*, 2009)

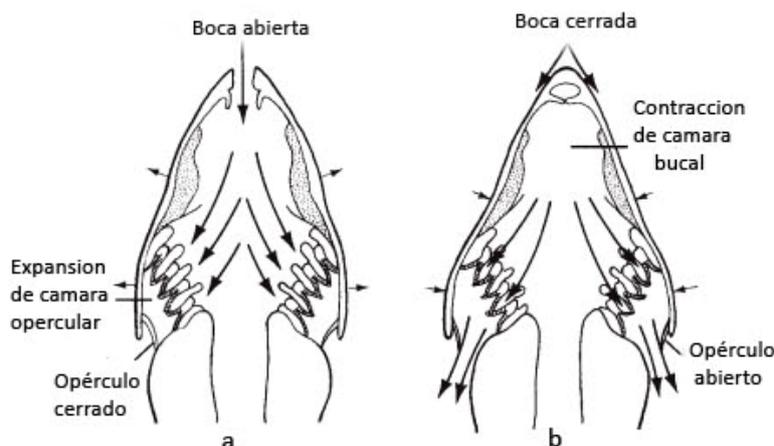


Figura 2.-Proceso de respiración de los peces. Modificado de Helfman *et al.* (2009)

Las malformaciones óseas se consideran una enfermedad no infecciosa, ya que son una desviación de la estructura o función normal del organismo, en la que no interviene algún agente patógeno (Koumoundouros, 2010), por lo que es importante el estudio del efecto que tienen las malformaciones del cuerpo en el desempeño biológico de los organismos cultivados.

Se han empleado diferentes técnicas de medición del estado de salud de los peces expuestos a los efectos de un agente estresor, entre las que se destacan el estudio del metabolismo (Fisk *et al.*, 2002; Tierney and Farrell, 2004; Lijalad and Powell, 2009a; Powell *et al.*, 2005; Roberts and Smith, 2011) y de los parámetros hematológicos (Li *et al.*, 2011; Saravanan *et al.*, 2011) los cuales se utilizaron en la presente investigación para para el estudio del impacto de las malformaciones.

1.3 Metabolismo

El metabolismo es la suma de todas las reacciones bioquímicas que se llevan a cabo en cada célula de un organismo, en los peces la tasa de consumo de oxígeno es a menudo utilizada como una medida indirecta de su tasa metabólica, la cual puede ser

influenciada por múltiples factores, como edad del pez, sexo, estado reproductivo, estado de salud, temperatura y salinidad, entre otros (Helfman *et al.*, 2009).

Los diferentes niveles de actividad metabólica se engloban en tres conceptos fundamentales. El primero es la tasa metabólica estándar, la cual se define cuando un pez permanece en completo reposo (sin movimiento), en ayuno (sin alimento en el tracto digestivo) y en condiciones normóxicas y normotérmicas. Este estado metabólico es el más próximo al metabolismo basal, que se define como la suma de reacciones metabólicas necesarias para mantener con vida al organismo (Silva and Anderson, 1994; Helfman *et al.*, 2009).

Debido a la dificultad que implica el mantener a un pez en completo reposo (sin el uso de anestésicos), mientras se cuantifica su tasa metabólica, es común que se utilice la tasa metabólica de rutina para estudiar el metabolismo de los peces. Esta tasa se define como aquella que se registra cuando un pez se mantiene en una condición libre de estresores y por lo tanto tiene eventos de actividad espontánea, además, también está en ayuno y en condiciones normóxicas y normotérmicas (Herrmann and Enders, 2000; Helfman *et al.*, 2009).

Por último, la tasa en la que se presenta mayor consumo de oxígeno es la tasa metabólica activa máxima, que es el punto en el cual el pez utiliza el oxígeno tan rápido como es consumido, por lo general está sujeto a un esfuerzo físico como el nado forzado (Stickney, 2000).

Las tasas metabólicas están influenciadas por diferentes variables físicas, químicas y fisiológicas, además de diferentes estresores, por lo que para describir el estado metabólico de un organismo, es necesario que se conozcan las condiciones ambientales en las que se desempeña, una de las variables ambientales que más afecta las tasas metabólicas y por lo tanto la fisiología de los organismos acuáticos, es la temperatura (Herrmann and Enders, 2000; Helfman *et al.*, 2009).

1.4 Hematología en peces

La hematología y la química clínica aplicada al estudio de los peces no son técnicas rutinarias para el diagnóstico de enfermedades, sin embargo pueden ser muy útiles en algunas circunstancias y necesarias para detectar algunos padecimientos asociados con las células sanguíneas, como el estudio de ciertos virus, detectables únicamente en los eritrocitos. También se han utilizado ampliamente para detectar estados de anemia, mediante la cuantificación del hematocrito y son una herramienta cada vez más utilizada para detectar cambios en el estado estructural y funcional de los peces bajo diferentes condiciones de estrés. El conteo de eritrocitos, hematocrito, forma y volumen de los eritrocitos, y la cantidad de hemoglobina, son algunos de los parámetros mayormente utilizados para tales propósitos (Noga, 2010; Saravanan *et al.*, 2011).

1.5 Hipótesis

El desarrollo óseo y sus malformaciones en *Totoaba macdonaldi* son similares a los de otros peces actinopterigios.

Las malformaciones operculares afectan la capacidad respiratoria, crecimiento y parámetros hematológicos en *T. macdonaldi*.

1.6 Objetivo General

Describir el desarrollo óseo de *Totoaba macdonaldi*, caracterizar las malformaciones óseas en términos de prevalencia, momento de aparición y huesos afectados y evaluar el efecto de las malformaciones más comunes sobre el desempeño biológico en organismos cultivados.

1.7 Objetivos particulares

- Describir el desarrollo óseo de *T. macdonaldi*

- Cuantificar el porcentaje y tipos de malformaciones en la producción de totoabas cultivadas en el laboratorio de peces marinos del CICESE
- Describir las malformaciones óseas y su proceso de formación.
- Evaluar el efecto de las malformaciones operculares sobre el desempeño biológico de las totoabas con base en el crecimiento, metabolismo y parámetros hematológicos (concentración de eritrocitos y hematocrito).

Capítulo 2.- Materiales y Métodos

Para el cumplimiento de los objetivos, el trabajo, se dividió en 2 fases: a) Diagnóstico y b) Pruebas de desempeño biológico.

2.1 Fase A: Diagnóstico

En esta fase se cuantificó la prevalencia de organismos con malformaciones en los cultivos que se desarrollaron durante las temporadas reproductivas 2015 y 2016, se aplicó un protocolo de cultivo larval estándar, utilizado en el laboratorio de peces marinos del CICESE, en el cual están establecidas las condiciones ambientales (oxígeno disuelto > 6 mmg/L, salinidad: 35 ups, temperatura: 26°C) y de alimentación para el cultivo larvario de *T. macdonaldi*. Se tomaron muestras de organismos durante el cultivo larvario para su posterior análisis y descripción del desarrollo del sistema óseo y las malformaciones generadas.

A finales de marzo del 2015, un lote de huevos de *T. macdonaldi*, procedentes del CREMES, fueron transportados en bolsas plásticas vía aérea y terrestre al laboratorio de peces marinos del CICESE, en donde fueron sembrados en incubadoras de forma cilíndrica, con fondo cónico y de 2000 L de capacidad, a una densidad de 50 a 100 huevos L⁻¹, para el cultivo se siguió el protocolo establecido en el laboratorio. Antes de la eclosión, no se aplicó flujo de agua ni de aire a las incubadoras, al tercer día después de la eclosión se suministraron rotíferos (*Brachionus plicatilis*), inicialmente 1 rotífero/ml y posteriormente se incrementó la concentración hasta cinco rotíferos/ml. La producción de rotíferos se hace con pasta de microalgas (Instant Algae, Reed Mariculture Inc. USA) y 12 h antes de suministrarlos a las larvas se enriquecen por 12 horas con Algamac 3000 (Aquafauna Biomarine), en una proporción de 0.3 g por millón de rotíferos y suministrado en dos raciones, una al inicio del enriquecimiento y otra a las seis horas de enriquecimiento. La etapa de transición de la alimentación con rotíferos a nauplios de *Artemia franciscana* es entre los 12 y 19 días después de la eclosión (DDE), durante este periodo se sustituyeron en forma gradual los rotíferos por nauplios de *Artemia*,

hasta alcanzar una concentración de 5 nauplios mL⁻¹. Los nauplios de *artemia* fueron enriquecidos con el mismo procedimiento descrito para rotíferos, pero utilizando 0.2 gr L⁻¹ 100 000 nauplios⁻¹. A partir del día 29 DDE se realizó la transición de alimentación con metanauplios de *artemia* alimento balanceado (Otohime® C1).

Algunos eventos importantes del desarrollo larvario de *T. macdonaldi* son el inflado de la vejiga natatoria, la flexión y postflexión de la notocorda y el momento en que se considera juvenil temprano (número de radios y espinas características de los adultos), los cuales se desarrollan durante los días 4, 10, 13 y 24 DDE a una temperatura de 24°C (Sandoval-Garibaldi, 2001), por lo que se tomaron muestras aleatorias de 15 a 30 organismos del tanque de cultivo larval, antes, durante y después de estos eventos. Estos organismos se utilizaron para la descripción del desarrollo, la medición de la longitud total y la detección y descripción de cualquier proceso anormal del desarrollo.

Las muestras de larvas obtenidas durante esta fase fueron fijadas en solución conservadora Davidson y posteriormente procesadas mediante una técnica de transparentación y tinción diferencial para la descripción del desarrollo esquelético.

Al final del periodo de cultivo larvario se hizo un muestreo masivo de 1261 organismos en etapa juvenil (50 DDE), y se cuantificó la proporción final de animales deformes producidos, el criterio de selección de deformes y sanos fue cualitativo y se hizo tomando en consideración las observaciones realizadas durante el cultivo larval y juvenil. Se calculó la proporción de organismos con malformaciones en la columna vertebral (lordosis, escoliosis, cifosis) y/o del cráneo (mandíbula y opérculos).

Los organismos deformes identificados durante esta primera etapa, se utilizaron para las pruebas de desempeño biológico.

En el año 2016 se recibieron dos desoves, el primero a mediados de abril (2016-1) y el segundo a principios de mayo (2016-2), del mismo laboratorio y siguiendo el mismo proceso de envío del año anterior. Las larvas se cultivaron con el mismo

protocolo estándar, a diferencia del enriquecimiento del alimento vivo, el cual se hizo con el producto comercial Origreen® (Skretting, Noruega), siguiendo las especificaciones del producto. De estos dos desoves se tomaron muestras de 50 larvas recién eclosionadas y se cuantificó el porcentaje de organismos con malformaciones. Al final del periodo larvario, en la etapa de juvenil, se realizó la cuantificación de las malformaciones en todos los organismos producidos en el año (2016-2) y del 25% de los juveniles producidos en el cultivo 2016-1. Para estudiar el desarrollo óseo, se tomaron muestras de larvas (20 organismos) los días 3, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 19, 22, 25 y 35 del primer desove y se fijaron con una solución de formol amortiguado con fosfatos (450 ml agua destilada, 50 mL de formaldehido para histología, 3.25 g NaH_2PO_4 y 2g $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$) para su transparentación y doble tinción.

La cantidad de luz en la superficie del agua medida con un luxometro (Fisher Scientific™ Traceable Dual-Range Light Meter) para los desoves del año 2015 y 2016-1 fue en promedio de 1142 ± 47 lux y de 1465 y 900 lux en el centro y en los bordes del tanque respectivamente. En el año 2016-2 el cultivo se realizó con una iluminación promedio de 77.14 ± 26 Lux y de 96 y 63 Lux en el centro y en los bordes de tanque.

2.2 Técnica de tinción y transparentación

Con el fin de analizar el desarrollo del esqueleto y detectar los huesos implicados en las malformaciones óseas, los organismos muestreados fueron procesados con la técnica de transparentación descrita por Darias *et al.* (2010), y siguiendo las recomendaciones de Gavaia *et al.* (2000). Esta técnica de transparentación, permite diferenciar los tejidos óseo y cartilaginoso mediante el uso de los colorantes azul alcian y rojo de alizarina que tienen afinidad por los tejidos cartilagosos y óseos respectivamente. Se hicieron los ajustes necesarios en la técnica, para la especie y los estadios estudiados.

Para el procesamiento de las muestras se inició con su lavado con agua potable durante 24 horas a flujo constante, se colocaron las muestras en cajas histológicas para facilitar el lavado (Figura 3a).

Posteriormente las muestras se lavaron 3 veces con agua destilada durante una hora; subsecuentemente se deshidrataron los tejidos transfiriendo las muestras de forma secuencial a soluciones de alcohol etílico con concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100% en intervalos de 2 horas. Las muestras permanecieron en alcohol absoluto por una noche antes de ser transferidas a acetona por 48 horas (figura 3a), se eliminó el exceso de acetona y se transfirieron a una solución de azul de alcian (0.01 g de azul de alcian en 60 mL de alcohol absoluto y 40mL de ácido acético glacial) para la tinción del cartílago, el periodo de tinción dependió del tamaño de la larva, se observó continuamente la absorción del colorante por el tejido cartilaginoso, para mantener el menor tiempo posible a los especímenes en esta solución, ya que puede descalcificar el tejido osificado.

Después de la tinción con azul de alcian, las larvas se rehidrataron con las soluciones de alcohol etílico a las mismas concentraciones y periodos utilizados en el proceso de deshidratación, pero en orden descendente, hasta llegar a agua destilada. El proceso de blanqueamiento se hizo sumergiendo a los organismos en una solución de hidróxido de potasio (1%) y agua oxigenada en proporción 9:1, durante este proceso es importante la observación en el microscopio estereoscopio para verificar el avance de la reacción. Para organismos grandes (35 DDE) este proceso toma más de un día e incluso se puede requerir la renovación del reactivo, en organismos pequeños (<35DDE), el proceso puede tomar unas cuantas horas. Al final de este proceso, los organismos deben adquirir un color blanco, los paquetes musculares son visibles y se desprenden por completo las escamas (Figura 3b).

Para el proceso de trasparentación se utilizó una solución de tripsina y borato de sodio (0.5g/30mL de solución saturada de borato de sodio), al igual que con el blanqueamiento, el proceso de reacción se debe monitorear para verificar el momento en que el musculo se torna transparente y el tejido esquelético, de color azul, es

claramente visible (Figura 3c). En organismos de estadios tempranos (3-8 DDE), este proceso no se aplicó por más de dos horas, aunque no es completamente necesario, solo se utilizó para ver con mayor claridad el cartílago pigmentado; en organismos medianos (10-22DDE), se requirió menos de un día para la transparentación y en los de mayor tamaño, se requirieron hasta dos o más días, la rapidez de este proceso de la temperatura.

Pasado este proceso se hicieron lavados con una solución de hidróxido de potasio al 2% (un día) y 1% hasta que la solución ya no adquiría un color azul, resultado del exceso de azul de alcán. La tinción con rojo de alizarina se realizó con una solución de rojo de alizarina de 0.2g/ 50mL de alcohol al 90%, los tiempos de tinción se adecuaron al tamaño de la larva (tabla 2). Subsecuentemente a la tinción del hueso, se hicieron lavados con soluciones de KOH al 1% y 0.5% para eliminar el colorante del musculo y visualizar claramente la tinción del hueso en los organismos tratados (Figura 3d).

Tabla 2.-Tiempo de exposición (horas) de los especímenes de distintas edades a los diferentes procesos de la técnica de transparentación y doble tinción.

DDE	Tinción con azul de alcán	Blanqueamiento	Transparentación	Tinción con rojo de alizarina
3	1	0.5	1	0.5
6	2	1	2	0.5
8	2	1	2	0.5
10	2	2	5	0.5
12	3	3	5	1
14	3	3	5	1
17	4	5	10	2
19	4	5	12	2
22	5	5	12	2
25	5	24	48	24
35	10	72	72	24

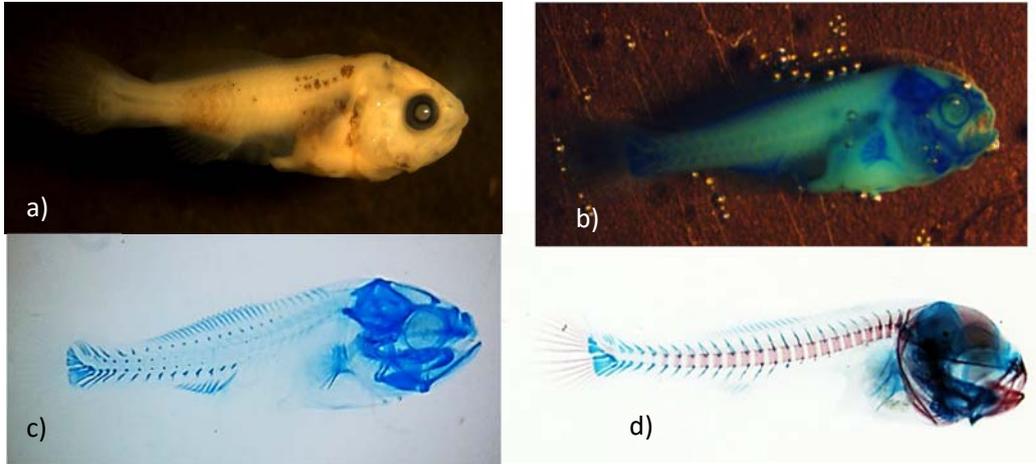


Figura 3.-Proceso de tinción y transparentación de larvas de totoabas. a) Organismo fijado y deshidratado b) Organismo después de la tinción con azul de alcian y blanqueamiento, c) Organismo después del macerado con la solución de tripsina y bórax d) Organismos después de la tinción con rojo de alizarina y lavado con la solución de hidróxido de potasio

2.3 Fase B: Pruebas de desempeño biológico

2.3.1 Crecimiento

Se llevó a cabo un experimento en el cual se evaluó el crecimiento de organismos juveniles de 60 DDE con malformación opercular monolateral (MOM), malformación opercular bilateral (MOB) y tomando como control organismos sin malformaciones óseas aparentes (sanos). Se colocaron 10 totoabas de cada condición en estanques de 120 L, cada una por triplicado (N=30) (Tabla 3).

Tabla 3.-Diseño experimental para el estudio del crecimiento de organismos con malformaciones operculares y sanos. MOM (Malformación opercular monolateral), MOB (Malformación opercular bilateral), Sanos (Organismos con ambos opérculos y sin malformación).

	MOM	MOB	Sanos
Replica a	MOM-a	MOB-a	Sanos-a
Replica b	MOM-b	MOB-b	Sanos-b
Replica c	MOM-c	MOB-c	Sanos-c

El bioensayo de crecimiento se hizo en nueve estanques de 120 L (100 l de volumen útil), cada grupo provisto de un sistema de recirculación, constituido por un filtro biológico-mecánico y un equipo de calentamiento/enfriamiento de agua (Heat pump DSHP-6, Aqua Logic), el cual fue programado para mantener la temperatura del agua en $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Figura 4). La asignación de cada condición a las unidades experimentales fue bajo un esquema de diseño por bloques completos al azar.

La alimentación de los organismos fue a saciedad, para lo cual se suministraron tres raciones diarias, se utilizó alimento de 55% de proteína (Skretting, Noruega) de 2 a 4 mm de diámetro de partícula, dependiendo del tamaño de los organismos y se cuantificó la cantidad de alimento consumido, como la diferencia entre el alimento suministrado y el alimento no consumido.

El mantenimiento del sistema de recirculación se hizo diariamente mediante el retrolavado de los filtros, limpieza del fondo de los tanques, ajuste de la salinidad por dilución con agua dulce, para mantenerla a 35 UPS y ajuste de pH y alcalinidad mediante la adición de bicarbonato de sodio, en una proporción equivalente al 20% del peso del alimento suministrado.

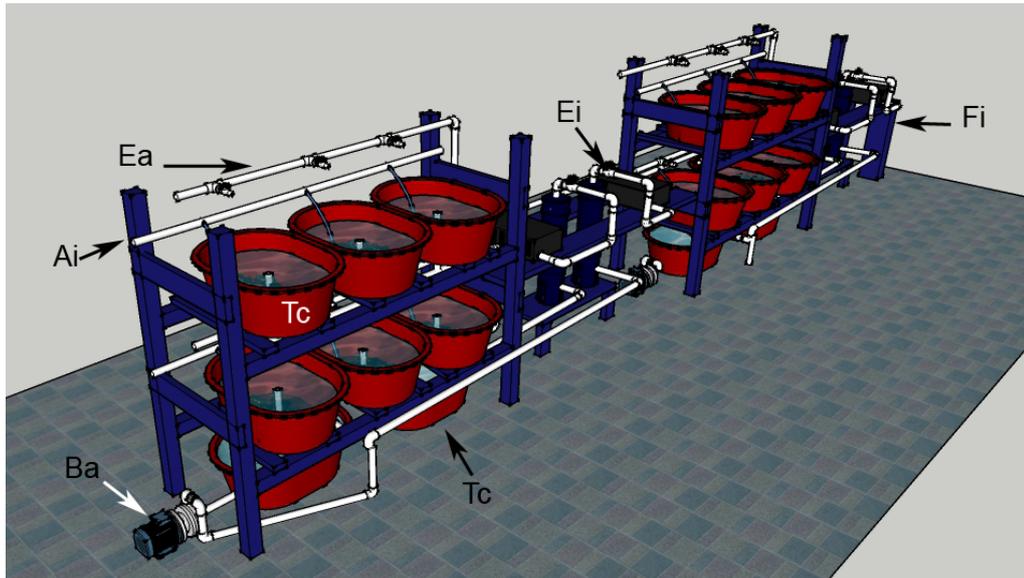


Figura 4. Sistema de recirculación para cultivo de juveniles de *Totoaba macdonaldi*. Tc-tanque de cultivo o unidad experimental, Ba- Bomba de agua, Ei- Equipos de intercambio de calor, Ai- Suministro de aireación, Tc- Tanque de compensación, Ea-Entrada de agua tratada a las unidades experimentales, Fi-Filtros mecánico biológicos.

Para la evaluación del crecimiento se hicieron biometrías cada dos semanas, tomando la longitud total y peso de los organismos, se calculó el crecimiento absoluto y relativo, así como las tasas de conversión alimenticia de cada condición de acuerdo a Minjarez-Osorio *et al.* (2012) las cuales se muestran a continuación.

$$\text{Ganancia en peso} = \text{Peso final} - \text{Peso inicial}$$

$$\% \text{ Ganancia en peso} = \left(\frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{\text{Peso inicial}} \right) \times 100$$

$$\text{Factor de condición} = \frac{\text{Peso humedo} \times 100}{\text{Longitud total}^3}$$

$$\text{Tasa específica de crecimiento} = \frac{\text{Ln peso final} - \text{Ln peso inicial}}{\text{tiempo}}$$

$$\text{Tasa de conversión alimenticia} = \frac{\text{Alimento consumido}}{\text{Peso ganado}}$$

2.3.2.-Pruebas de metabolismo activo

Se estudió el metabolismo activo de 9 totoabas juveniles de 25.54 ± 0.26 cm de longitud total, 3 de cada condición (MOM, MOB y Sanos).

Las totoabas se mantuvieron en ayuno por 24 horas antes de ser anestesiadas con 1 ml/L de una solución de aceite de clavo (1mL de aceite en 5mL de alcohol al 70%), hasta que perdieron el equilibrio y no presentaran más movimiento que el de la ventilación branquial (Figura 5a). A continuación se colocaron en un equipo para medición de metabolismo (Loligo® Systems) el cual consta de un túnel de nado de 90 litros de capacidad acoplado a un medidor de oxígeno de luminiscencia y de temperatura (FIBOX 3 Presens®, Alemania) y un equipo (hardware) que recibe las señales de los sensores de oxígeno y temperatura, a su vez el canal de nado consta de una cámara exterior y la cámara de medición en donde se pone al organismo (Figura 5c).

La velocidad del agua en el interior del túnel de nado fue de 15.3 ± 0.2 cm seg^{-1} . Para tal propósito se utilizó una bomba de agua (bomba B1) (Leader® ecopool 15 de 1.5hp y 115v), y para renovar el agua dentro de la cámara de medición con el fin de mantener el agua libre de desechos nitrogenados y oxigenada, se utilizó una bomba auxiliar (bomba B2) (EHEIM®120V, 2400Lh^{-1}), la cual renovaba el agua cada 8 minutos, intercambiando agua entre la cámara exterior y la cámara de medición (Figura 5c).

Las medidas de temperatura y concentración de oxígeno dentro de la cámara metabólica del túnel fueron procesados por el software Autoresp 1, el cual calcula la tasa metabólica y la expresa como el consumo de oxígeno por unidad de biomasa del pez y por unidad de tiempo ($\text{mg O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Las mediciones del metabolismo activo se hicieron durante 24 horas, transcurrido este tiempo, las totoabas se retiraron del túnel de nado y fueron sacrificadas por sobredosis de anestesia para registrar el peso y la longitud total.

El análisis de datos del metabolismo consistió inicialmente en definir la fase de normalización metabólica y la del metabolismo activo, durante esta última fase se definieron dos estados, de menor y mayor actividad, por lo cual se utilizó el programa Matlab R2016a, se graficaron las medidas de la tasa metabólica específica ($\text{mgO}_2/\text{kg}/\text{h}$) en función del tiempo (horas), y se hizo el ajuste de estos datos a una curva de tercer grado mediante mínimos cuadrados, de la ecuación resultante se obtuvo la primera derivada, la cual también se graficó en relación con el tiempo. Se analizaron los resultados de todos los bioensayos y se estableció un intervalo de -3 a +5 valores de la derivada de la ecuación del metabolismo, en el cual se encontró un comportamiento estable de la tasa metabólica, se calcularon los deciles superior e inferior de este grupo de datos y se utilizaron para hacer las comparaciones estadísticas entre las tres condiciones experimentales (MOM, MOB y Sanos).

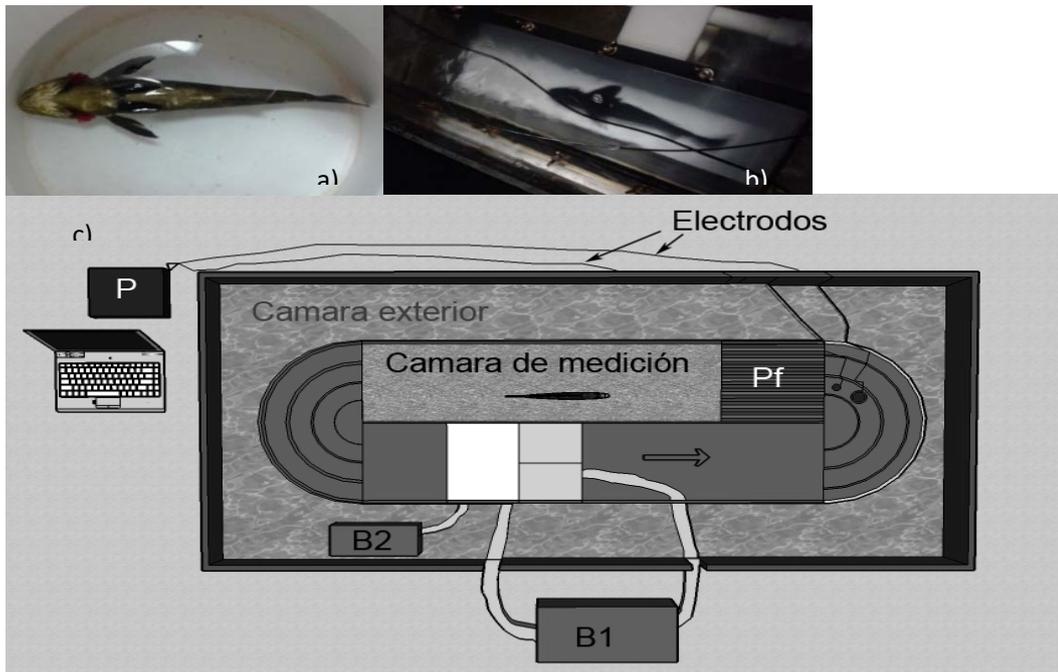


Figura 5.-Medición de metabolismo activo de juveniles de totoaba a) organismo con MOB anestesiado b) organismo en el túnel de nado durante medición, c) Diagrama del canal de nado utilizado para la medición del metabolismo activo, B1-Bomba uno, B2-Bomba dos, Pf-Placa para mantener el fluido laminar, P-procesador de señales de electrodos.

2.3.3 Parámetros hematológicos

Los parámetros hematológicos que se midieron fueron el hematocrito y la concentración de eritrocitos. Se tomaron diez organismos sanos, diez organismos sin un opérculo (MOM) y nueve organismos sin dos opérculos (MOB), todos de 9 meses de edad con una longitud total promedio de 28.72 ± 2.38 cm, los cuales fueron anestesiados con una solución de aceite de clavo, misma que se utilizó durante las pruebas de metabolismo activo. Una vez anestesiados, se les extrajo una muestra de sangre, haciendo una punción en la región ventral del pedúnculo caudal, se tomaron de 2 a 5 mL de sangre de la vena caudal (Figura 6a), en seguida se depositaron en tubos de polipropileno transparente para recolección de sangre (tubos BD Microcontainer®) con anticoagulante, de esta muestra de sangre se tomó una porción para el análisis de hematocrito y otra para el recuento celular.

De la muestra de sangre de cada totoaba, se llenó por capilaridad un tubo capilar para hematocrito (Aris, soda lime glass), las muestras se centrifugaron en grupos de 10, en una centrifuga para hematocrito (Clay Adams®) por 10 minutos a 27,000 RPM (revoluciones por minuto) después de centrifugar las muestras, se formaron 2 fases, una con las células sanguíneas (color rojo) y la otra con el plasma (transparente), los tubos capilares se colocaron en un lector de hematocrito (Adams micro-hematocrit reader), para cuantificar el porcentaje de células sanguíneas con respecto al volumen total de sangre (Figura 6c).

Para el recuento celular se hizo una dilución de la muestra de 1:200, utilizando 20 µL de sangre en 4 mL de solución de Natt-Herrick, la mezcla reposó por un periodo de entre dos y cinco horas, para lograr la tinción celular y realizar el recuento. La identificación de eritrocitos se hizo de acuerdo con las características de la tinción y forma del núcleo, tomando como referencia las características de las células sanguíneas del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* (Del Rio-Zaragoza *et al.*, 2011). Cada muestra se colocó en una cámara de Neubauer, se mantuvo en reposo durante 10 minutos para que las células sanguíneas se sedimentaran, a continuación se contaron los eritrocitos en 5 cuadros de la parte central de la cámara por triplicado (Figura 6d). Para obtener la concentración de eritrocitos se aplicó la siguiente formula (Schreck *et al.*, 1990):

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Número de eritrocitos} \times 1}{0.02} \times 200$$

Donde:

Número de eritrocitos= suma de los eritrocitos contados en los 5 cuadros.

200= factor de dilución.

2.4 Análisis estadístico

Para el análisis del crecimiento de los organismos MOM, MOB y sanos se aplicó un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía de crecimiento (TEC), transformado con la función arco seno. Se realizó también un análisis de varianza de una vía de los parámetros fisicoquímicos (temperatura, salinidad, oxígeno) entre cada tratamiento (MOM, MOB, Sanos). Tanto para el análisis de los parámetros de crecimiento y parámetros fisicoquímicos se hizo con un nivel de significancia de 0.05 y fueron verificados los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad.

Los datos del metabolismo activo superior, inferior y su intervalo, fueron analizados mediante un ANDEVA de una vía, con un nivel de significancia de 0.05. En los casos en que se obtuvieron diferencias significativas se procedió a hacer una prueba pos hoc de Tukey, para identificar los tratamientos diferentes.

Para el análisis de concentración de eritrocitos y hematocrito también se verificaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas y posteriormente se aplicó un análisis de varianza entre las tres condiciones.

Capítulo 3.-Resultados

3.1 Fase A: Diagnóstico

Para la descripción del desarrollo larvario de *T. macdonaldi* se tomaron muestras de organismos los días 11, 12, 14, 17, 19, 23, 25, 27, 29, 33, 37 y 42 DDE. En la figura 6 se presenta el modelo de crecimiento en longitud total de las larvas de totoaba.

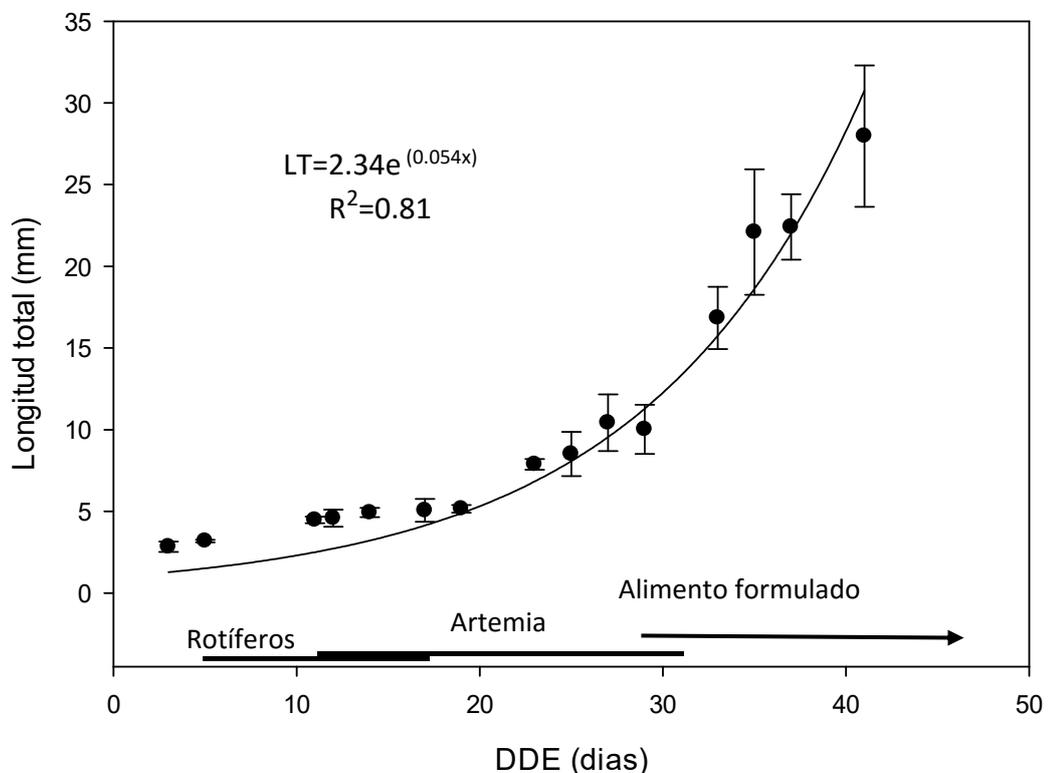


Figura 6.-Crecimiento de las larvas de totoaba bajo un protocolo de cultivo estándar.

El crecimiento larval es discontinuo, se distinguen dos fases, la primera del día 2 al 19 DDE donde la tasa de crecimiento es menor y sigue una tendencia lineal, la tasa específica de crecimiento fue de 0.03. En la segunda fase, de los 19 a los 41 DDE se aprecia un crecimiento exponencial, la tasa específica de crecimiento fue de 0.07, es decir 1.8 veces más que en la primera etapa, reflejo del rápido crecimiento.

En la tabla 4 se muestra el desarrollo de *T. macdonaldi* desde el momento de la eclosión hasta la etapa de juvenil temprano, los mayores cambios morfológicos,

como el desarrollo de las aletas, opérculos, desarrollo del notocordio y la cobertura de cromatóforos, se presentan en los primeros días, a partir del día 23-25 los cambios son menos evidentes y solo aumentan su tamaño.

3.1.1 Transparentación y doble tinción

Los organismos que se colectaron y fijaron durante el primer año no se pudieron teñir con la solución de rojo de alizarina, debido a que la solución fijadora de Davidson ocasiona la descalcificación, por lo que solo se pudo hacer la tinción del cartílago con la solución de azul de alcian, que tiene gran afinidad por los mucopolisacáridos en pH bajos (1-2).

La pigmentación del tejido cartilaginoso con azul de alcian y del tejido óseo con rojo de alizarina se llevó a cabo de manera exitosa durante el segundo año de muestreo, en los organismos recolectados y fijados con formol amortiguado (pH-7). Uno de los aspectos críticos durante el procesamiento de las muestras con esta técnica es la tinción con azul de alcian, debido a que se corre el riesgo de descalcificar al organismo, ya que la solución de azul de alcian tiene un pH ácido, el tiempo en que se logra que el cartílago tenga una buena absorción de colorante depende del tamaño de la larva, como se muestran en la tabla 2.

Durante el proceso de blanqueamiento se eliminaron los cromatóforos y todo el color en la piel, la eliminación de escamas fue necesaria a partir de los 25 DDE, para lo cual, con la ayuda de una espátula pequeña, se realizó un raspado sobre la piel del organismo. Durante el proceso de blanqueamiento se presentó el problema de la formación de burbujas en los tejidos u órganos de los especímenes, como en el estómago, cabeza, intestino o músculo, dichas burbujas se pudieron eliminar mecánicamente mediante punción, pero otras, como las que se formaron dentro de los músculos o cráneo no se pudieron eliminar, lo que puede dificultar la observación de algunas estructuras del esqueleto.

**Tabla 4.-Desarrollo larvario de *Totoaba macdonaldi* y sus principales cambios morfológicos
LT: Longitud total.**

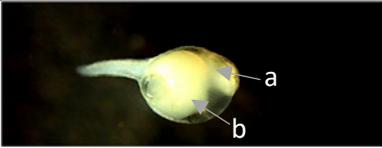
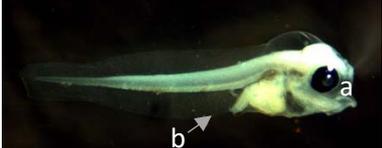
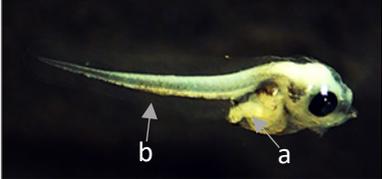
DDE	Imagen	Descripción
0		<p>Vista ventral de una larva recién eclosionada, LT=0.91±0.76 mm. Saco vitelino grande (b) 0.89±0.04 mm de largo y 0.65±0.03 mm de ancho, más de la mitad de la longitud del pez, ninguna aleta formada, no se observa boca ni ano abiertos, solo se observan los globos oculares (a)</p>
3		<p>LT=2.84±0.32. Boca (a) y ano (b) abiertos, tamaño de la boca 0.3±0.01 mm de alto y 0.24±0.02 mm de ancho. Sin aletas dorsal, caudal o ventral, presencia de aletas pectorales, absorción completa de saco vitelino. Protuberancia en la parte dorsal de la cabeza. Inicia alimentación con rotíferos.</p>
5		<p>LT=3.19±0.07 mm. Sin saco vitelino, mandíbula superior en desarrollo, presencia temprana de cromatóforos(a, b), cabeza sin protuberancia en la parte dorsal.</p>

Tabla 3.-Continuación

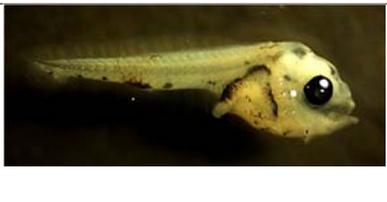
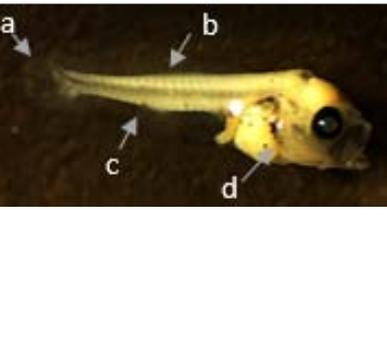
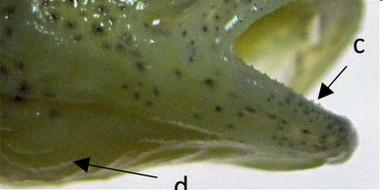
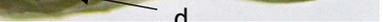
7		<p>LT=4.48±0.20 mm. Crecimiento de mandíbula superior. En etapa de pre flexión, el notocordio es aún recto (a), la flecha indica las áreas de proliferación de cromatóforos al día 5 DDE.</p>
12		<p>LT=4.59±0.52 mm. Empieza etapa de flexión, final del notocordio en dirección ascendente (a), se empiezan a formar los huesos de la aleta caudal, mayor proliferación de cromatóforos.</p>
14		<p>LT=4.93±0.29mm. etapa transición de flexión,</p>
19		<p>LT=5.16±0.24mm. Etapa de flexión avanzada, el final del notocordio más prolongado en dirección ascendente (a), empieza el crecimiento de aletas dorsal y anal (b, c), presencia de branquias y opérculos (d).Inicia alimentación con artemia.</p>
23	 	<p>LT=7.88±0.32mm</p> <p>Los organismos reflejan de luz en forma multicolor (iridioforos). Etapa de postflexion con todas las aletas bien formadas.</p> <p>A partir de esta etapa, se incrementa la cobertura cromatóforos y escamas en todo el cuerpo.</p>

Tabla 3.-Continuación

25		LT=8.52±1.35mm.
27		LT=10.43±1.74mm, la presencia de escamas es más notoria.
29		LT=10.02±1.50 mm. Algunos organismos nadan de manera anormal formando círculos en la superficie, se observa la deformación en la columna
33		LT=16.85±1.91mm.juveniles tempranos con las aletas con espinas y radios bien desarrollados a)
35		LT=22.10±3.83mm. Detalle de línea lateral b).
37		LT=22.41±2.10mm. Detalle de mandíbula inferior y dientes caniniformes bien desarrollados.
41		LT=27.96±4.32mm. d) Detalle de radios branquiostegos.

3.1.2 Desarrollo óseo de *Totoaba macdonaldi*

De manera general, Cailliet *et al.*(1986) clasifican el esqueleto de los peces óseos en axial y apendicular. El esqueleto axial comprende el cráneo y la columna vertebral, algunos componentes del cráneo son las mandíbulas inferior y superior, opérculo, subopérculo, interopérculo, y neurocráneo. El esqueleto apendicular comprende las aletas, en *T. macdonaldi* son siete, la aleta caudal, anal, dorsal, un par de aletas pectorales y un par de aletas pélvicas (Figura 7a). Los huesos de soporte de las aletas, llamados lepidotriquios, están presentes en las aletas dorsal y anal (Figura 7 c y d) a diferencia de los huesos de soporte de las aletas pélvicas y caudal basipterigio y placa hemal respectivamente (Figura 7a).

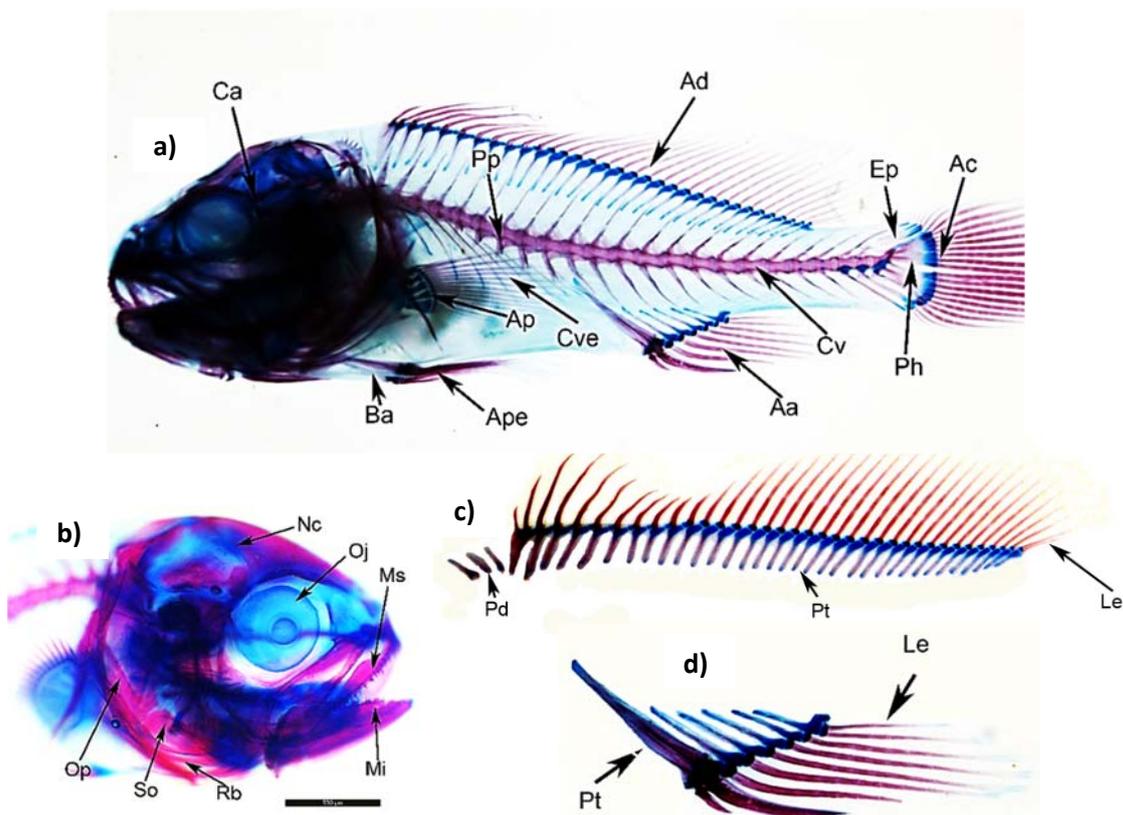


Figura 7.-Sistema esquelético de *Totoaba macdonaldi*, principales partes del esqueleto axial y apendicular a) Esqueleto completo de juvenil de 25DDE, Ca-Cabeza, Pp-Parapofisis, Ad-Aleta dorsal, Ac-Aleta caudal, Ape-Aleta pélvica, Aa-Aleta anal, Cve-Costilla ventral, Ba-Basipterigio, Ph-Placa hipural, Cv-Columna vertebral, Cve-Costillas ventrales, Ep-Epurales, B) Cabeza, Nc-Neurocráneo, Oj-Ojo, Ms-Mandíbula superior, Mi-Mandíbula inferior, Rb-Rayos branquiostegos, So-Sub opérculo, Op- Opérculo, c) aleta dorsal, Pd-predorsales, Pt-Pterigioforo, Le-Lepidotriquia , d) aleta anal.

Una vez mencionado de manera general los componentes esqueléticos en *T. macdonaldi* a continuación se describe a detalle el desarrollo de los 5 hasta 35 DDE. En primer término se analizó el desarrollo de la región craneal, el resto del esqueleto axial y apendicular.

Días 5 y 6 DE. A los 5DDE los primeros huesos en iniciar su desarrollo se encuentran en la cabeza, se observa el cartílago de Meckel (Figura 8) y el cartílago etmoidal los cuales dan origen a las mandíbula inferior y superior respectivamente, también se observan los arcos branquiales bien pigmentados en color azul (cartílago) (Figura 8). A los 6 DDE Aparecen las primeras dos espinas neurales en la parte dorsal anterior del notocordio, el cual da origen a la columna vertebral (Figura 9). En la sección final del notocordio todavía no se observa el desarrollo de la aleta caudal. No se observan procesos de osificación en ninguna región del cuerpo.

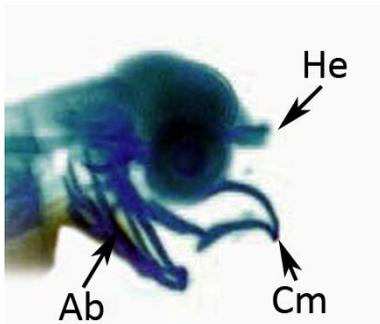


Figura 8.-Cabeza de larva de 5DDE. He-cartílago etmoidal, Ab-arcos branquiales, Cm-cartílago de Meckel.

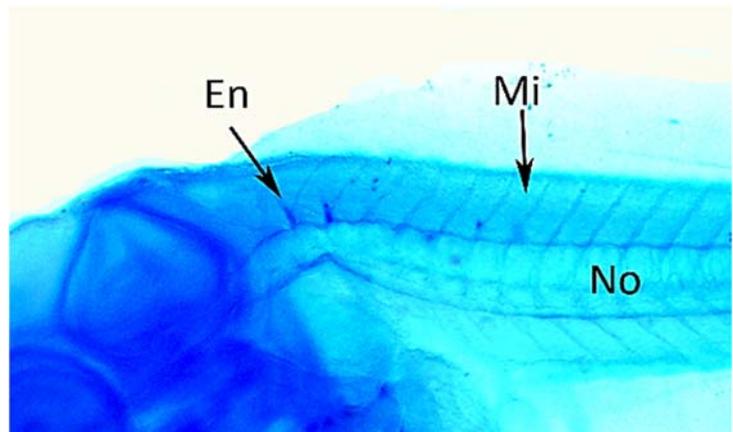


Figura 9.-Parte anterior del notocordio de larva de 6 DDE. En-Espinas neurales, Mi-Miómeros, No-Notocordio

Día 8 DDE. Empieza la osificación de la mandíbula, de los huesos premaxilares y dentarios (mandíbula superior e inferior), los arcos branquiales se observan claramente de composición cartilaginosa. El notocordio es recto, sin osificación, se observan de 3 a 4 espinas neurales (Figura 10) y de 9 a 11 espinas hemales en la parte posterior ventral del notocordio (Figura 10). En cuanto al esqueleto apendicular, la aleta pectoral es la primera en desarrollarse y está formada por

cartílago. El coracoide está en proceso de desarrollo y está formado por cartílago, se observa también el desarrollo de la aleta caudal constituida por cartílago. Las placas hipurales (en estadios avanzados forman la placa hipural), aún no están bien definidas, se observan entre 2 y 3 piezas. En la cabeza, la maxila y el dentario se encuentran en estado transitorio entre cartílago y hueso, los opérculos se observan muy delgados pero en estado osificado (solo visibles dorsalmente), los arcos branquiales permanecen aún como cartílago y aún no se observan los rayos branquiostegos. También las espinas hemales y prehemales ya son evidentes (ca. 20), pero ninguna está osificada. Inicia el desarrollo de la aleta dorsal con la presencia de pterigióforos cartilaginosos aunque, aún no están bien definidos

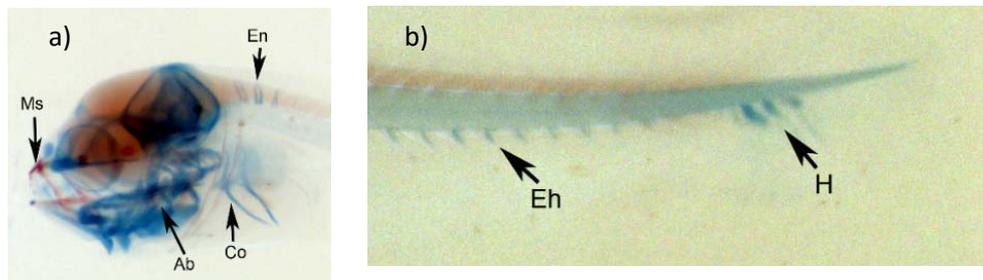


Figura 10.-Larva de 8 DDE a) Cabeza Ms-mandíbula superior, En-Espinas neurales (3) Co-Coracoide, Ab-Arcos branquiales y b) Región posterior del notocordio Eh-Espinas hemales, H-Hipurales

Día 10 DDE. Se observan los rayos branquiostegos osificados, sin haber pasado por una etapa cartilaginosa. La mandíbula superior e inferior están osificadas, los arcos branquiales aún están formados por cartílago, los opérculos aún se observan delgados y osificados y en el borde contienen una pequeña franja de cartílago (Figura 11). Comienza la osificación de la columna vertebral en dirección anteroposterior, se observan de 16 a 18 vertebras osificadas, son evidentes todas las espinas neurales (24) de las cuales las primeras dos (las primeras en aparecer constituidas por cartílago) ya están osificadas (Figura 12) (cambio de color azul a morado), La cintura escapular sigue desarrollándose con la aparición del cleitro y el coracoide aún sigue en estado cartilaginosos. En la aleta caudal las placas hipurales y parhipurales aún son cartilaginosas.



Figura 11.-Cabeza de larva de 10 DDE.

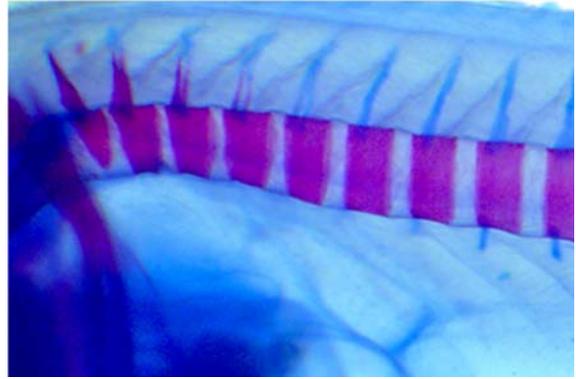


Figura 12.-Larva de 10 DDE, proceso de osificación de las espinas neurales.

Día 12 DE. Mayor osificación de la columna vertebral y de las espinas neurales en sentido anteroposterior. El urostilo aparece osificado antes de que se osifiquen todas las vértebras anteriores, lo más temprano que se observó fue en la osificación de la vértebra 20 (dirección anteroposterior). La pleura central aun no está osificada (Figura 13).

Los elementos de las aletas pectorales son de cartílago. Las espinas de la aleta anal se observan con mayor claridad y definición y están constituidas por cartílago, son 7 y las anteriores son de mayor longitud. Se aprecian 24 pterigióforos de la aleta anal. Se observan 3 huesos epurales sobre el urostilo. Las placas hipurales de la aleta caudal, parhipurales y epurales aún están formadas por cartílago, comienza la separación entre las hipurales 1 y 2 de las hipurales 3, 4 y 5 (figura 13).

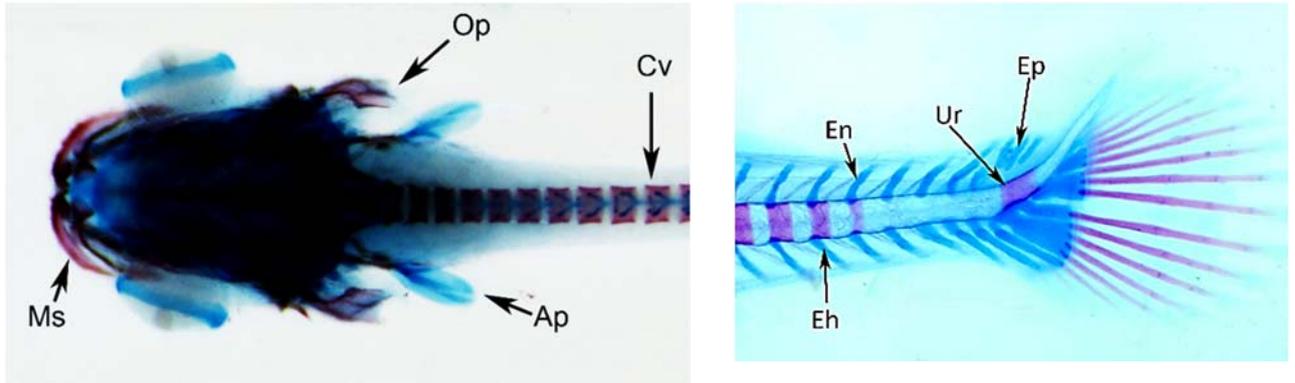


Figura 13.- Larva de 12 DDE. Izquierda-Vista dorsal de la cabeza, Derecha-Aleta caudal. Op- Opérculo, Ms-Mandíbula superior, Ap-Aleta pectoral, Cv-Columna vertebral, En-Espina neural, Eh-Espina hemal, Ur-Urostilo, Ep- Epurales.

Día 14 DE. La columna vertebral, constituida por 25 vertebras, incluyendo el urostilo, está completamente osificada, las espinas neurales y hemales se encuentran en transición de cartílago a hueso, las cinco piezas hipurales que forman parte del soporte de la aleta caudal comienzan el proceso de osificación, Los pterigióforos de las aletas dorsal y anal aún son de cartílago, siete en la aleta anal con 8 espinas, al parecer los primeros dos pterigióforos están fusionados. Las espinas neurales y hemales distales aún están constituidas por cartílago. Se aprecian 31 pterigióforos de la aleta dorsal aún como cartílago, con 30 espinas osificadas. Los elementos de la aleta caudal se empiezan a osificar.

Día 17 DE. Los huesos de la mandíbula, opérculos, y radios branquiostegos ya están osificados, solo los arcos branquiales están en proceso de osificación. Todas las vértebras, las espinas hemales, neurales y parapófis (5) ya se encuentran osificadas. Aún no se observan costillas ventrales. Ya se observan osificados los radios o lepidotriquias de todas las aletas (dorsal, caudal, anal, pectoral y pélvicas). Los hipurales, parhipural y epurales (Figura 14) se encuentran en proceso de osificación al igual que los pterigióforos y predorsales de la aleta dorsal y los pterigióforos de las aletas anal y pélvicas.

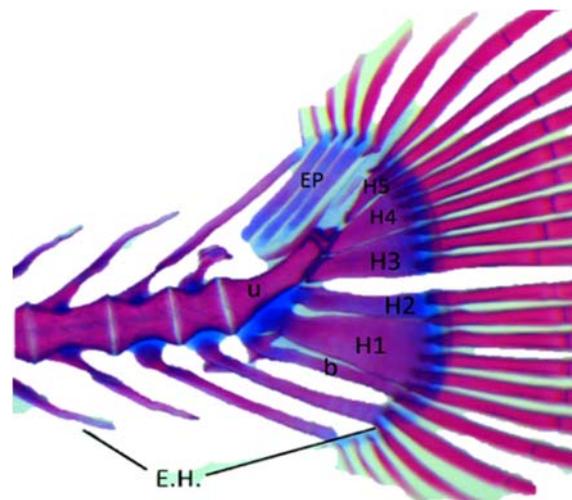


Figura 14.-Aleta caudal de organismos de 17 DDE. H1-H5:Hipurales, b:Parhipural, U:urostilo, Ep-epurales

Día 19 DE. El esqueleto axial y la cabeza tienen el mayor grado de osificación. Es visible el proceso de osificación de las costillas y las demás partes (vertebras y espinas hemales y neurales) ya están osificadas. En la cabeza solamente los arcos branquiales siguen en proceso de osificación.

Día 22-35 DDE. En la cabeza, prácticamente todos sus elementos están osificados, solo se observa cartílago en las órbitas, el cual se clasifica como cartílago escleral (Boglione *et al.*, 2013b). En el esqueleto axial solo faltan por osificarse las costillas ventrales, proceso que se completa a los 25 DDE. En la aleta caudal, la osificación de todos sus elementos se da a los 35 DDE, solo la base de los radios está constituida por cartílago, que de acuerdo con Boglione *et al.* (2013b), es de tipo

hialino, lo mismo ocurre en la aleta dorsal. En la cintura escapular la osificación del coracoide comienza hasta los 25 DDE y hasta el día 35 aún permanece en proceso de osificación, en la aleta pectoral los pterigióforos proximales también permanecen como cartílago, esta aleta es la última en terminar su proceso de osificación.

En la figura 15 y tabla 5 se presenta un resumen del proceso de desarrollo y osificación de las diferentes piezas óseas durante el desarrollo larval de *T.macdonaldi*.

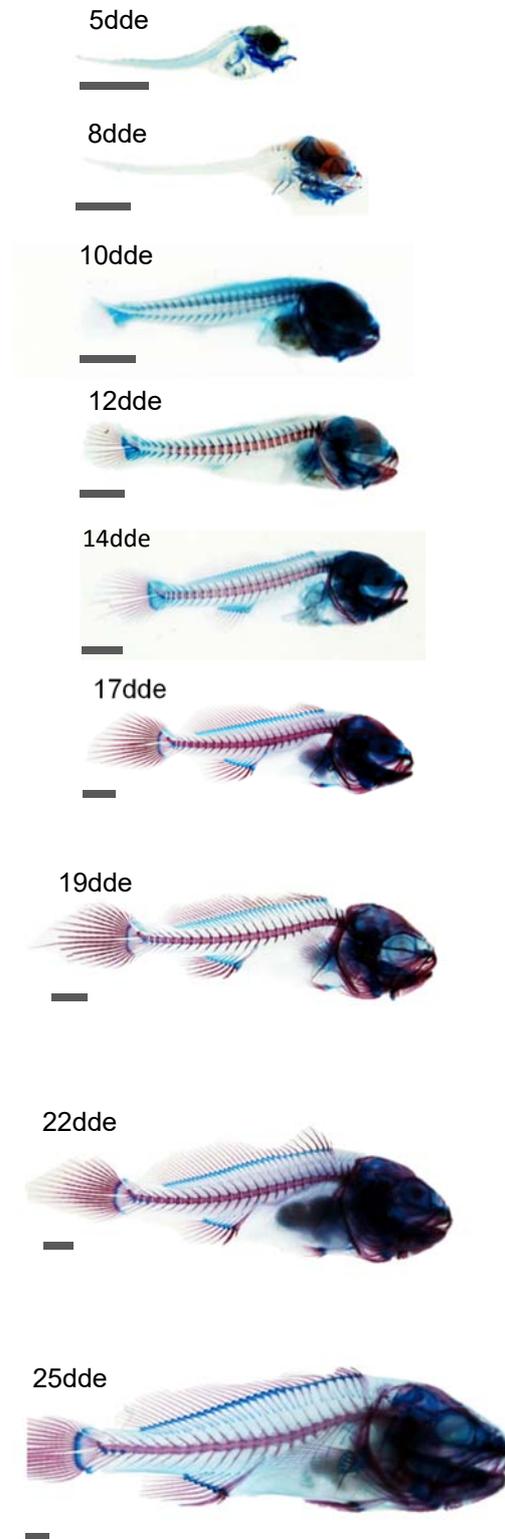


Figura 15.- Desarrollo esquelético de *Totoaba macdonaldi*, la barra gris equivale a 1mm.

Tabla 5.-Resumen del proceso de desarrollo y osificación de las diferentes piezas óseas durante el desarrollo larval de *T. macdonaldi*. Ca- cartílago, CH- transición de cartílago a hueso, PO-Proceso de osificación, X- piezas completas, *-pieza ausente.

		Días después de eclosión									
Pieza ósea		5	8	10	12	14	17	19	22	25	35
Cabeza	Premaxila	Ca	CH	Os	Os	Os	Os	Os	Os	Os	Os
	Dentario	Ca	CH	Os	Os	Os	Os	Os	Os	Os	Os
	Opérculos	*	PO	PO	Os	Os	Os	Os	Os	Os	Os
	Rayos branquiostegos	*	*	Os	Os	Os	Os	Os	Os	Os	Os
	Arcos branquiales	ca	Ca	Ca	Ca	CH	CH	CH	CH	CH	Os
Columna vertebral	Vertebral centra			PO	PO	X, OS	OS	OS	OS	OS	OS
	Urostilo		*	*	Os	Os	Os	Os	Os	Os	Os
	Espinas hemales	*	Ca	X, Ca	CH	CH	Os	Os	Os	Os	Os
	Espinas neurales	*	Ca	X, CH	CH	CH	OS	OS	OS	OS	OS
	Costillas ventrales	*	*	*	*	*	*	CH	CH	CH	OS
	Parapofisis	*	*	Ca	Ca	CH	Os	Os	Os	Os	Os

Tabla 5.-continuación

		Días después de eclosión									
		5	8	10	12	14	17	19	22	25	35
Aleta dorsal	Pieza ósea										
	Pterigióforos	*	*	Ca	Ca	X, Ca	CH	CH	CH	CH	Os
	Lepidotriquia	*	*	*		OS	Os	Os	Os	Os	Os
Aleta anal	Predorsales	*	*	*	x, Ca	Ca	CH	CH	CH	CH	Os
	Pterigióforos	*	*	*	Ca	X, Ca	CH	CH	CH	CH	CH
	Rayos distales	*	*	*	*	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca
Aletas pectorales	Lepidotriquia	*	*	*	*	Os	Os	Os	Os	Os	Os
	Cleithrum	*	*	Os	Os	Os	Os	Os	Os	Os	Os
	Coracoide	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca	CH	CH
	Pterigióforos proximales	*	*	*	*	*	Ca	Ca	Ca	Ca	Ca
Aleta caudal	Radius distales	*	*	*	*	*	Os	Os	Os	Os	Os
	Preural centra	*	*	*	Os	Os	Os	Os	Os	Os	Os
	Hipurales		Ca	X, Ca	Ca	CH	CH	CH	CH	Os	Os
	Parhipurales	*	Ca	Ca	Ca	Ca	CH	CH	CH	OS	OS
	Epurales	*	*	Ca	ca	ca	CH	CH	CH	CH	Os
	Uroneurales	*	*	*	*	*	*	Os	Os	Os	Os
Aleta pelvica	Lepidotriquia			Os	Os	Os	Os	Os	Os	Os	Os
	Basipterigio	*	*	*	*	Ca	Ca	CH	CH	OS	OS
	Espinas	*	*	*	*	*	*	Os	Os	Os	Os

3.1.3 Malformaciones durante el cultivo larval y anomalías detectadas

La distribución de las larvas en la incubadora mostró un patrón común en los tres lotes cultivados, durante los primeros 3 DDE, las larvas se distribuyeron prácticamente en toda la columna de agua. En los días subsecuentes, se fueron congregando en las paredes del tanque y en el fondo, entre los 12 al 17 DDE, prácticamente todas las larvas se encontraban en las paredes de la incubadora (Figura 16). Este comportamiento empezó a disminuir a partir de los 31 a 35 DDE, en la etapa de alimentación con alimento balanceado, entonces, los juveniles ya se distribuían uniformemente en todo el tanque de cultivo. A continuación se describen en forma cronológica las malformaciones que se observaron durante el desarrollo.



Figura16.-Incubadora con larvas de *Totoaba macdonadi* congregadas en las paredes del tanque

3.1.3.1 Malformaciones del notocordio

El diámetro de los huevos de los desoves 2016-1 y 2016-2 fueron similares (842 ± 5 y 846 ± 3 μm respectivamente). En larvas recién eclosionadas se presentaron malformaciones del notocordio (Figura 17), en el primer desove se presentó una prevalencia de 28.4% y para el segundo de 27.2%, aunque se observó una gran cantidad de huevos con embriones deformes en la etapa de neurula, estos huevos se sedimentaron y fueron retirados del cultivo, por lo que solo se conservaron los huevos flotantes. Las larvas deformes tuvieron una conducta anormal, las que presentaron un mayor grado de malformación nadaban en círculos, y aquellas con menor grado de

deformación no seguían una trayectoria recta al desplazarse, en los días subsecuentes se presentó gran mortalidad de estas larvas.

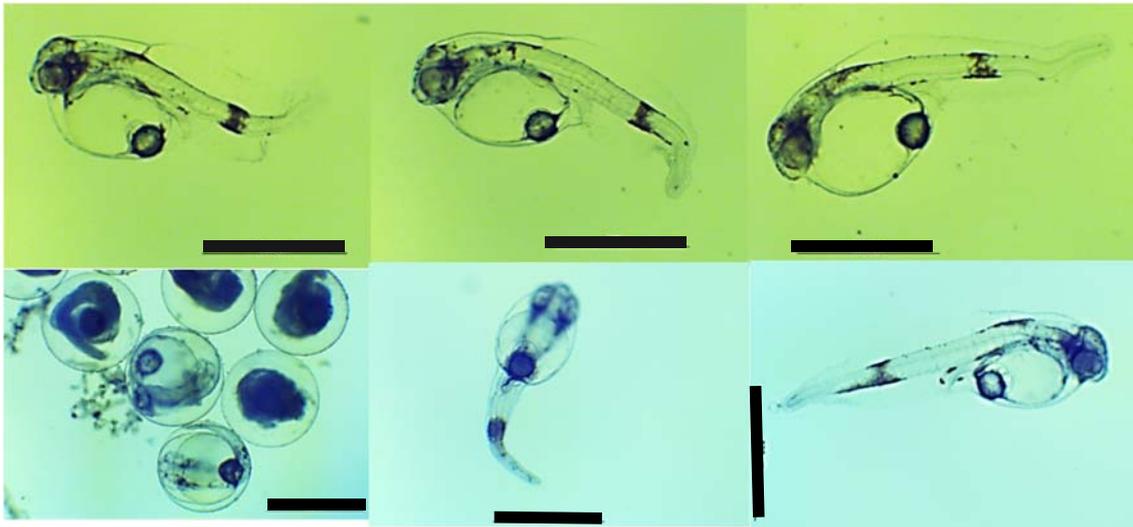


Figura 17.-Huevos y larvas recién eclosionadas de *Totoaba macdonaldi*, con malformaciones de la notocorda. La barra equivale a 500 μ m

3.1.3.2 Malformaciones de la columna y anomalías del desarrollo de la vejiga gaseosa

A los 27 DDE se observaron algunas larvas nadando con dificultad en la superficie del tanque (<10 larvas), ya que permanecían de costado en la superficie del agua. Se detectaron malformaciones de la columna al día 29 DDE en las larvas del desove del año uno, en esta edad, las larvas se alimentaron con nauplios de *Artemia*, tenían un desarrollo avanzado de la pigmentación en el cuerpo, algunas prácticamente con todo el cuerpo pigmentado.

Para el día 29 DDE la cantidad de larvas con problemas de natación aumentó, más de 100 organismos permanecían en la superficie nadando en círculos y con la región ventral del cuerpo hacia la superficie del tanque, se observó que las larvas deformes tenían una menor longitud y el grado de repleción estomacal era menor, debido a su incapacidad para consumir alimento.

Entre los 27 y 30 DDE se observó flotación y malformación de las larvas, posteriormente todas las larvas con estas características murieron y fueron retiradas de la superficie del tanque. La técnica de transparentación y tinción permitió observar que las malformaciones consistieron en desviaciones de la columna (Figura 18), dos cifosis, una en las vértebras cefálicas, situada después del neurocráneo y otra en las vértebras caudales, específicamente en el pedúnculo caudal, todos los organismos de esta condición transparentados (10 organismos) presentaron estas malformaciones en menor o mayor grado.

En los dos lotes de larvas cultivadas durante el año 2, no se presentaron eventos de hiperinflado de la vejiga, sin embargo, entre los 25 y 28 DDE se presentó un evento de mortalidad, pero en este caso, el comportamiento de las larvas indicaba la falta de inflado de la vejiga natatoria, ya que muchas (>100) presentaron una conducta natatoria anormal, tratando de salir a la superficie y con dificultad para nadar, dichos organismos también murieron, de manera similar al evento de mortalidad del 2015.

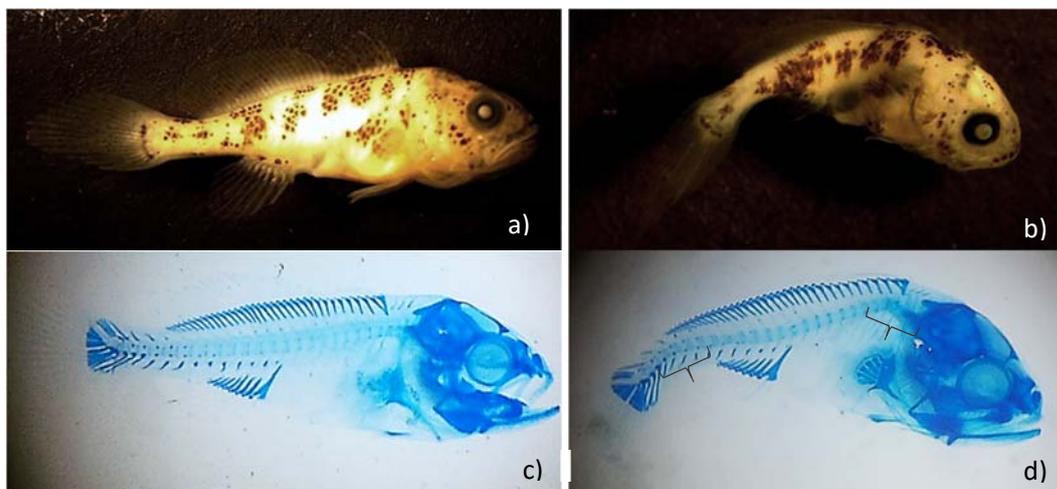


Figura 18.- Organismo de 29DDE sano (a) y con malformación de la columna (b) antes (a, b) y después (c, d) de la técnica de transparentación y tinción, las llaves indican cifosis.

3.1.3.3 Malformaciones operculares

Al día 33 DDE se detectaron por primera vez anomalías operculares, se observaron organismos con una pequeña fisura en el área opercular, a través de la cual se exponían las branquias (Figura 19a), en las larvas sanas no se observó la exposición de las branquias (Figura 19 b).

La observación de estos organismos después del proceso de transparentación evidenció la afectación opercular, que consistió en un doblez en el borde del opérculo que se proyectaba hacia el interior de la cámara branquial (Figura 19 d, g). No se identificó algún comportamiento diferente entre los organismos deformes y sanos.

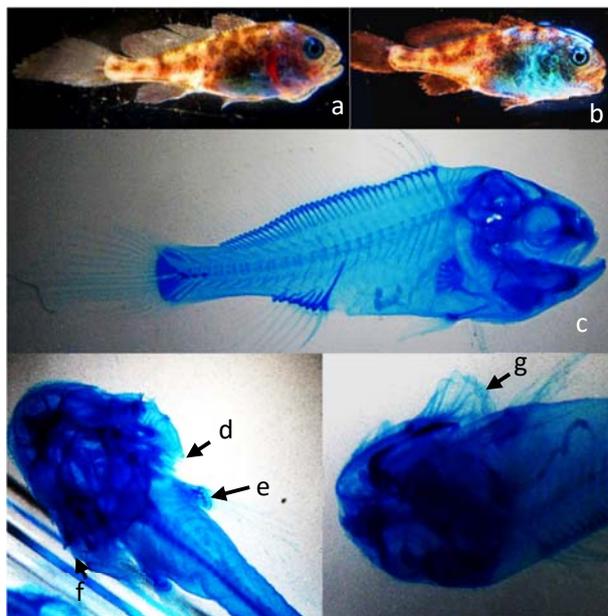


Figura 19.-Organismos de 33 DDE sanos y con deformidad opercular antes y después del proceso de transparentación y tinción. a) Organismo con deformidad opercular, b) Organismo sano, c) Organismo sano, d) Opérculo malformado con exposición de branquias, e) aleta pectoral, f) opérculo sano, g) opérculo malformado.

En el segundo año de muestreo se pudo hacer una detección más temprana de las malformaciones operculares, las cuales se detectaron a los 17 DDE y para el día 19 DDE ya eran evidentes. En estos organismos transparentados se encontró que para el

día 17 los opérculos de los organismos tanto sanos como deformes ya se encontraban osificados (Figura 20)



Figura 20.-Larva de *Totoaba macdonaldi* de 19 DDE con malformación opercular monolateral y opérculos osificados.

3.1.4 Malformaciones en la etapa juvenil temprana.

En el primer año se realizó un muestreo de 1261 organismos juveniles (producción total), de una edad entre los 53 y 55 DDE donde se encontraron diferentes malformaciones. El 23% de los juveniles presentaron alguna malformación, entre las de mayor prevalencia estuvieron las operculares, de uno (66%) y dos opérculos (27%), seguido de las malformaciones de la columna (5%), de la vejiga natatoria (1%) y de las mandíbulas (1%) (Figura 23).

A los 55 DDE, aquellos organismos con alguna malformación opercular (mono o bilateral), no tenían otra malformación aparente, sin embargo, entre los 97 a 157 DDE (etapa de cultivo), desarrollaron otras anomalías óseas. Los organismos con deformación de la vejiga presentaron una desviación en la columna, aunque a diferencia de los peces que se clasificaron solo con deformación de columna, estos tenían dificultades para nadar, lo hacían en forma errática y permanecían en la superficie del tanque y no desarrollaron la capacidad para alimentarse. Algunos organismos con malformación de la columna también tenían malformación de opérculos (Figura 23).

Para evaluar la prevalencia de malformaciones en el cultivo larval del segundo año (2016-1), se hizo un muestreo de 112 juveniles (20% de la producción total) de 45 DDE, de una longitud total promedio de 6.6 ± 0.2 cm y se cuantificó un 23.2% de organismos de deformes, al igual que el primer año las malformaciones más comunes fueron las de los opérculos, monolateral (54.17%) y bilateral (16.67%), en este año no se observaron malformaciones la de vejiga gaseosa ni de la mandíbula, pero si se encontraron algunas totoabas con el cuerpo corto (20.83%) (Figura 21 y 23).

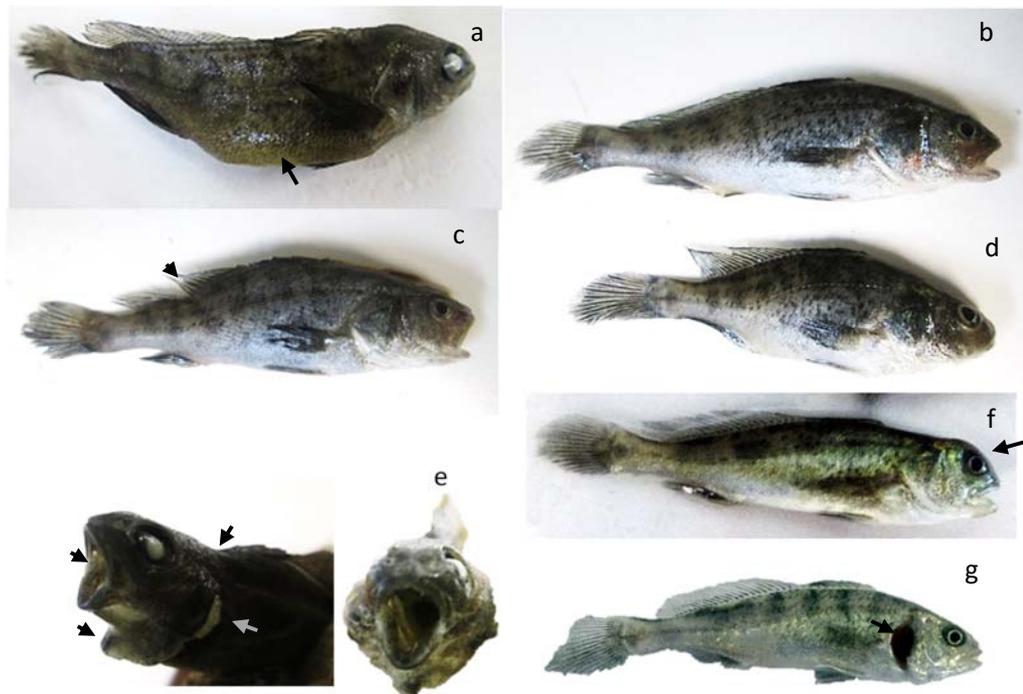


Figura 21.- Distintas morfologías en juveniles de *Totoaba macdonaldi* producidos en el laboratorio de peces marinos del CICESE. a) Malformación de la vejiga natatoria (2015), b) Organismos normal, c) Malformación del dorso o “saddleback-like” síndrome (2016-1), d) Cuerpo acortado (2016-1), e) Malformación de la mandíbula inferior, opérculos y columna (2015), f) Malformación del cráneo, g) malformación opercular (2016-2).

Los organismos con el cuerpo corto se identificaron por sus características anatómicas, al comparar el índice longitud/alto entre organismos de 49 DDE normales y deformes, se encontró que en los deformes era de 3.6 ± 0.2 y en los sanos de 4.4 ± 0.2 , al hacer la

tinción y transparentación de los organismos con cuerpo corto, se pudo corroborar la malformación de la columna vertebral (Figura 22).

En el segundo desove del año dos (2016-2) hubo un evento de mortalidad masiva a los 17 DDE, provocada por el parásito *Amyloodinium* sp., lo que redujo la supervivencia al final del cultivo, así, la cantidad de juveniles producida fue menor que en los dos cultivos anteriores. Al finalizar el cultivo (45 DDE), se cuantificó una prevalencia de malformaciones del 17.25% en la población total (487 juveniles), de las cuales, el 86.9% presentaron malformación opercular monolateral, el 8.33% malformación bilateral y en menor proporción se presentaron organismos con el cuerpo corto (2.3%) y con malformación de la mandíbula (2.38%) (Figura 23).

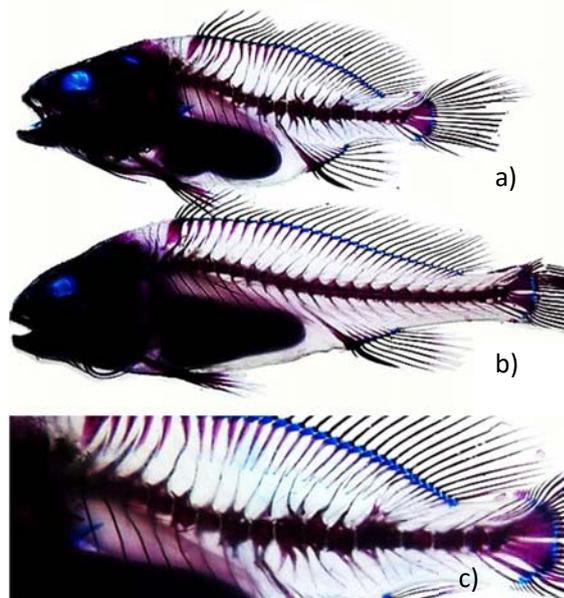


Figura 22.-Juveniles de 35 DDE después de la técnica de transparentación y doble tinción (2016-2), a) Organismos con fusión vertebral (cuerpo corto), b) Organismo sano, c) Columna vertebral con fusión vertebral y malformación de las espinas hemales y neurales.

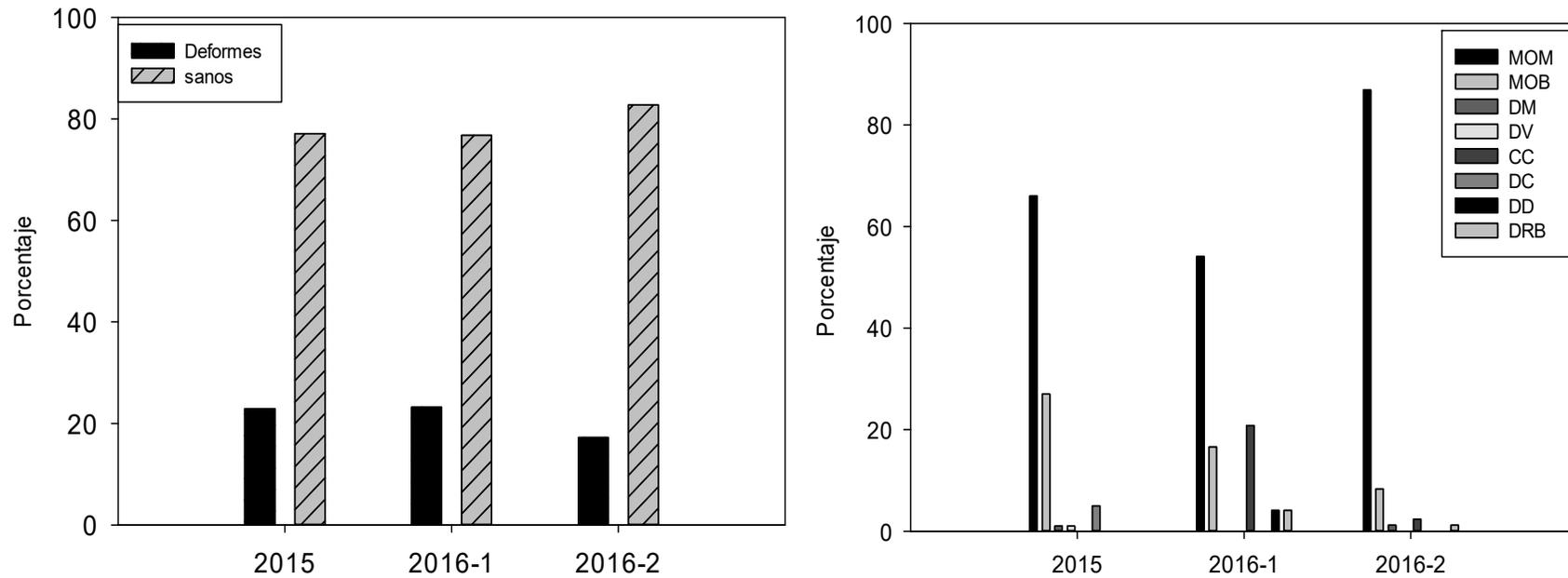


Figura 23.-Prevalencia de malformaciones óseas en juveniles de *Totoaba macdonaldi* cultivados. Izquierda, prevalencia de malformaciones óseas en tres lotes de juveniles. Derecha, proporción de malformaciones por categoría en cada lote de juveniles. MOM-malformación opercular mono lateral, MOB-Malformación opercular bilateral, DM-Deformación de mandíbula, DV-Deformación de vejiga gaseosa, CC- Cuerpo corto, DD-Deformación de aleta dorsal, DRB-Malformación de rayos branquiestegos.

3.2 Desempeño biológico

3.2.1 Cultivo de juveniles

El cultivo de juveniles de totoaba se mantuvo en condiciones de temperatura, salinidad, oxígeno y pH muy similares entre las unidades experimentales (Tabla 6). La temperatura se mantuvo entre 24 y 25 °C, el oxígeno se encontraba por arriba de 5 mg/l prácticamente durante todo el experimento, a excepción del último día de cultivo en donde se registró una concentración promedio de 4.8 mg/l en el tratamiento MOM. Las máximas concentraciones de oxígeno se registraron al inicio del experimento, con un máximo de 6.9 mg/l en el tratamiento de organismos sanos.

La salinidad promedio se mantuvo alrededor de 34 UPS, sin embargo, tuvo una fluctuación entre 31 y 39 UPS a los 23 y 39 días de cultivo respectivamente. Debido a que el sistema de cultivo fue semicerrado, los valores bajos de pH no se pudieron regular y se mantuvieron entre 7 y 8. El análisis de varianza no demostró diferencias significativas en los parámetros fisicoquímicos entre los tratamientos (Temperatura: $p=0.08$; Oxígeno: $p=0.91$; salinidad: $p=0.93$; pH: 0.76).

Tabla 6.-Parámetros fisicoquímicos promedio (\pm D.E) de cada condición registrada durante el cultivo de organismos sanos, con malformación opercular mono lateral (MOM) y malformación opercular bilateral (MOB).

CONDICIÓN	TEMPERATURA (°C)	SALINIDAD (UPS)	OXÍGENO (mg/l)	pH
SANOS	24.66 \pm 0.4	34.71 \pm 1.86	5.81 \pm 0.46	7.46 \pm 0.2 8
MOM	24.45 \pm 0.5	34.86 \pm 1.74	5.85 \pm 0.43	7.49 \pm 0.3 1
MOB	24.49 \pm 0.5	34.73 \pm 1.71	5.84 \pm 0.43	7.41 \pm 0.3 0

Durante el cultivo de juveniles de totoaba no se registró mortalidad relacionada con las malformaciones, ya que los organismos que murieron habían saltar fuera de los tanques de cultivo. No se encontraron diferencias en el crecimiento en peso ($P=0.9$), aunque al final del experimento (153 días), se observó que los pesos de los organismos de cada condición comenzaron a separarse (Figura 24). El pez más grande entre los que tenían deformación opercular monolateral tuvo un peso de 143 gramos y una longitud de 23.3 cm, cabe destacar que este organismos prácticamente ya había regenerado el opérculo faltante. El organismo con menor peso de la condición de malformación opercular bilateral tenía un peso de 43 gramos y una longitud de 17cm.

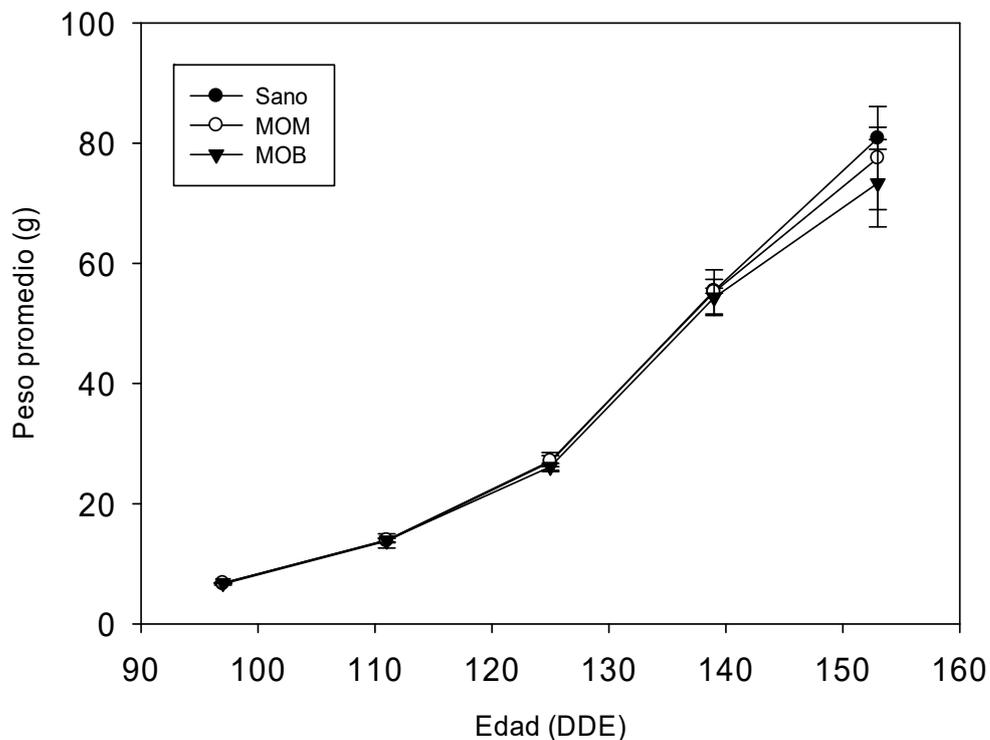


Figura 24.-Crecimiento de juveniles de *Totoaba macdonaldi* sanos y deformes (MOM, malformación opercular mono lateral y MOB, malformación opercular bilateral), durante los dos meses de cultivo.

Los parámetros de crecimiento entre las tres condiciones fueron muy similares en el tiempo entre las diferentes condiciones (Tabla 7), aunque de manera similar al crecimiento, el factor de condición y la tasa específica de crecimiento calculados al final

del experimento fueron menores en los organismos con MOB, en comparación con los organismos sanos y con MOM.

Tabla 7.-Parámetros de crecimiento de juveniles de *Totoaba macdonaldi*.

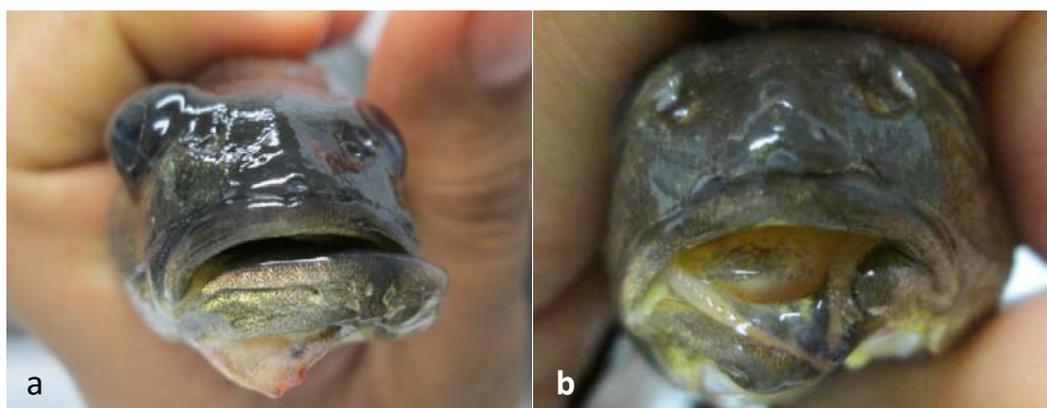
	Sanos	MOM	MOB
Peso inicial	6.66±0.19	6.75±0.04	6.83±0.07
Peso final	80.82±1.82	77.52±8.57	73.34±7.24
Ganancia en peso (gr)	74.21±1.52	70.74±8.61	66.51±7.20
Ganancia en peso %	1114.26±17.78	1043.15±129.34	973.47±100.13
LT inicial (cm)	8.34±0.04	8.42±0.04	8.52±0.08
LT final (cm)	20.01±0.48	19.68±0.37	19.65±0.67
Supervivencia (%)	90.00±14.14	93.33±11.54	93.33±5.77
Factor de condición final	1.00±0.02	1.01±0.06	0.96±0.01
Tasa de específica de crecimiento	4.17±0.05	4.05±0.20	3.95±0.16
Tasa de conversión alimenticia	0.60±0.09	0.59±0.01	0.59±0.08

3.2.1.1 Malformaciones desarrolladas durante el cultivo

En la biometría inicial sólo se hizo la selección de organismos de acuerdo a la presencia o ausencia de malformaciones operculares y para el grupo control (sanos) se seleccionaron aquellos peces en los cuales no fue evidente ninguna deformación. Durante el cultivo se desarrollaron y acentuaron algunas otras malformaciones, como en la mandíbula inferior y la columna vertebral.

La deformación de la mandíbula presentó dos patrones de desviación, una en el plano vertical y la segunda en el plano horizontal (Figura 25). Las malformaciones de la columna fueron cifosis y lordosis.

El desarrollo de otras malformaciones fue más común en organismos con malformación opercular bilateral (MOB), ya que en el 21% de estos organismos se desarrolló otra malformación. En los organismos con malformación opercular monolateral (MOM), la incidencia de una segunda malformación fue de 18% y en los organismos sanos solo el 16% desarrollo alguna malformación.



**Figura 25.-Deformación de mandíbula inferior de juveniles de *Totoaba macdonaldi*.
a) Desviación en el plano horizontal, b) desviación en el plano vertical**

Al término de la fase de cultivo de los juveniles, se seleccionaron algunos organismos que presentaban las malformaciones óseas más desarrolladas, se sacrificaron y se tomaron radiografías (JOB XRAY modelo 100HF y un digitalizador CR Vita 2013), las imágenes radiográficas se muestran en las figuras 27 y 28.

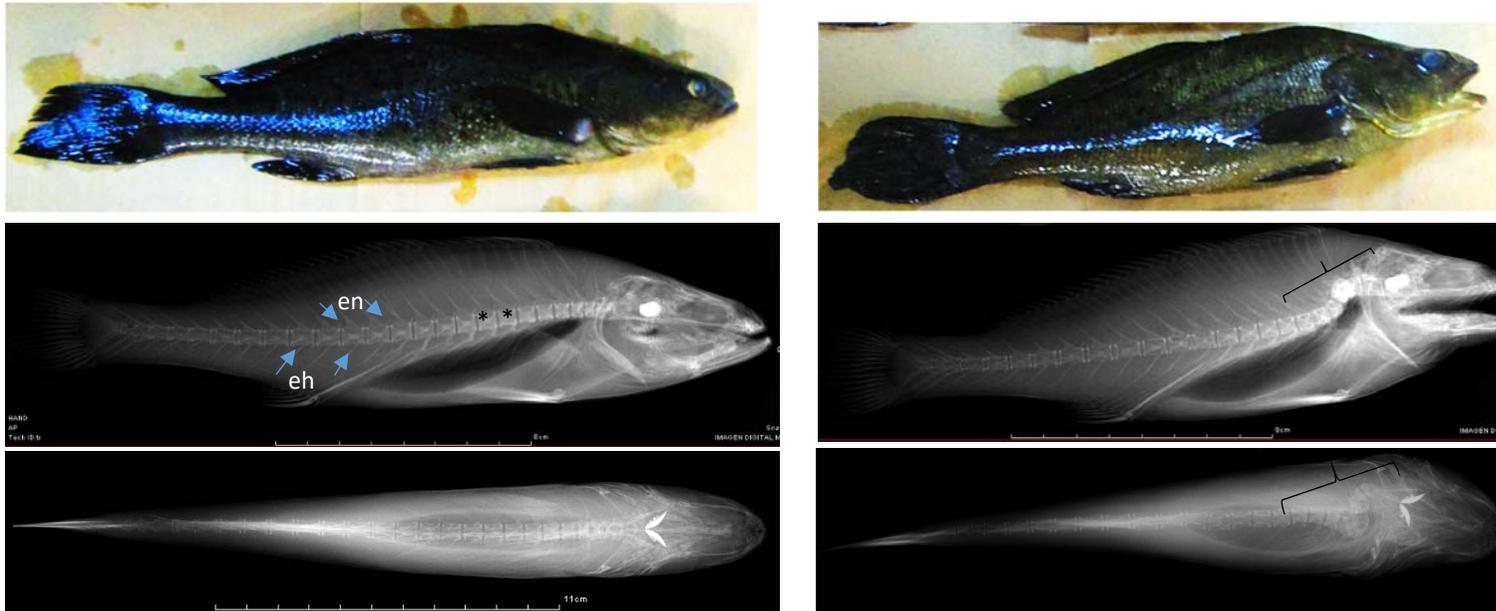


Figura 26.-Radiografía de un organismos sano (izq) y de un organismo con deformación de la columna vertebral (lordosis) (der) en-espina neural, eh-espina hemal, Vn-Vejiga natatoria, *-vértebras, las llaves indican las regiones de la columna con malformación

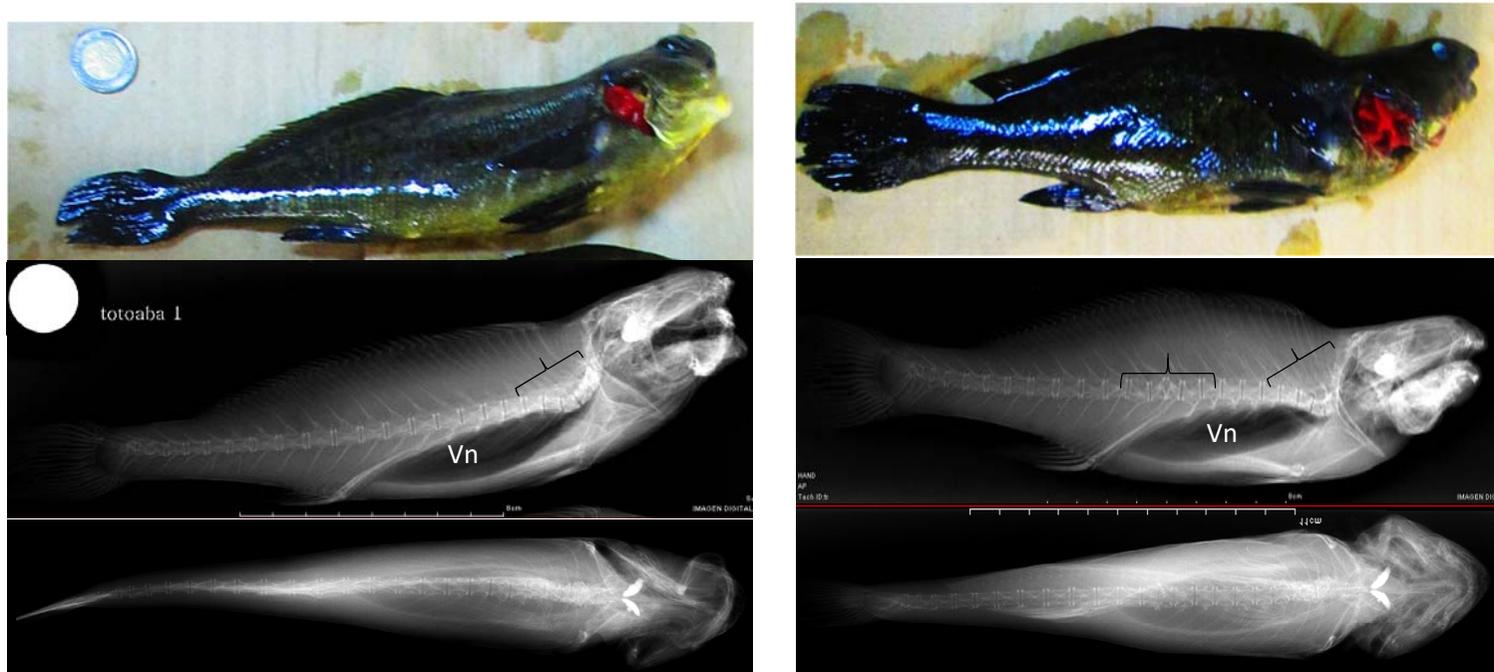


Figura 27.-Radiografías de juveniles de totoaba con diferentes malformaciones. Derecha, deformación opercular mono lateral, cifosis y desviación del eje horizontal de la mandíbula inferior. Izquierda, organismo con deformación opercular mono lateral, cifosis y desviación de la mandíbula inferior en el plano vertical, las llaves indican las regiones de la columna con malformación; cv, compresión vertebral.

En todas las totoabas con malformación opercular se observó un doblez del hueso opercular y subopercular hacia el interior de la cavidad branquial, la posición de la vejiga natatoria varía entre los diferentes organismos, con respecto a la vista dorsal de un organismo normal (Figura 26), en el que la columna vertebral pasa justo en medio de la vejiga gaseosa, en contraste, en los organismos con deformación de la columna, la vejiga está desplazada hacia uno u otro lado del cuerpo. Las malformaciones de la columna vertebral se presentan en la parte anterior del cuerpo, justo después de la cabeza, ya sea en eventos de lordosis o cifosis. También se observó compresión vertebral y deformación de las espinas neurales (Figura 27, panel derecho). Este proceso de compresión no elimina la articulación intervertebral (Figura 28), a diferencia del organismo que se clasificó como cuerpo corto y con fusión vertebral (Figura 22), en el que las articulaciones intervertebrales están ausentes,

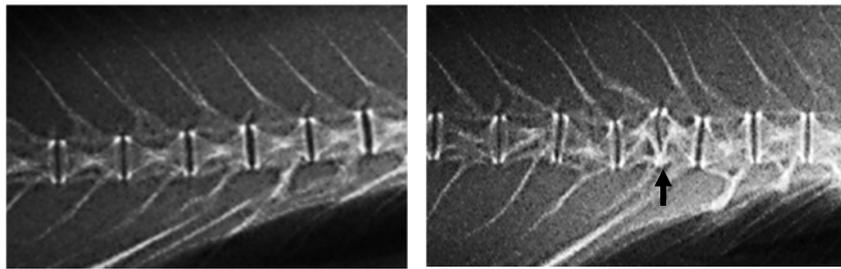


Figura 28.-Vertebras normales (derecha) y compresión vertebral (izquierda) y deformación de espinas neurales y hemales, la flecha indica el espacio intervertebral.

3.2.1.2 Recuperación opercular

A medida que se desarrolló el cultivo, también se desarrollaron otras malformaciones en los juveniles, se observó la recuperación de los opérculos (Figura 29) en el 11% de los organismos con MOM y en el 17% de los organismo con MOB. En los peces con regeneración del opérculo, la apariencia de esta estructura fue diferente de aquellos con el opérculo normal, ya que tenía una apariencia rugosa, y una revisión de las

branquias, indicó una disposición anormal de las lamelas del primer arco branquial, posiblemente como resultado de su larga exposición al medio.

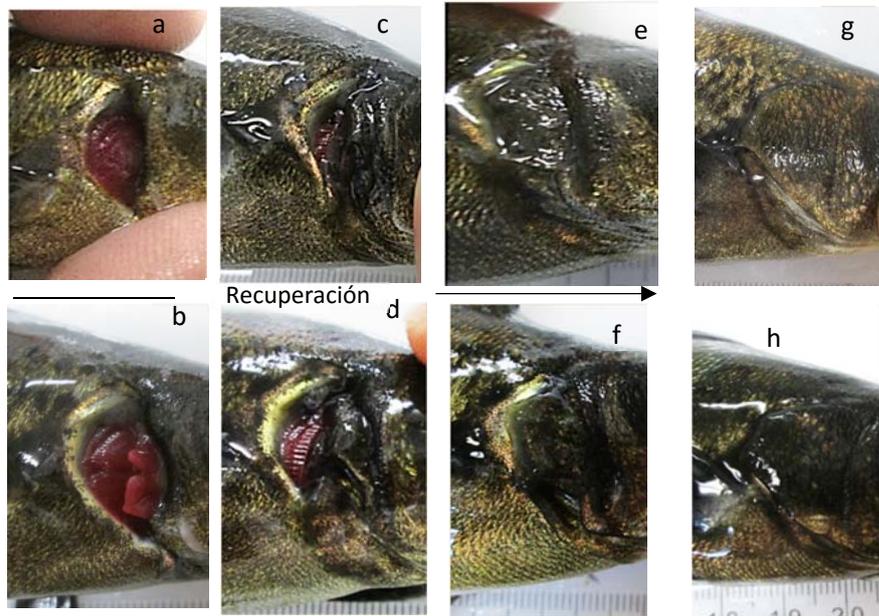


Figura 29.-Organismos juveniles de totoaba con opérculos en diferentes condiciones a,b.-opérculos deformes, c,d.-opérculos en proceso de recuperación, e,f.-opérculos recuperados con superficie rugosa, g,h.-opérculos de organismos normales.

3.2.2 Metabolismo activo

El comportamiento de la tasa metabólica de las totoabas sanas y con deformación opercular fue similar, al principio del bioensayo la tasa fue mayor, como resultado del estrés inducido por la transferencia del estanque de cultivo al túnel de nado. A partir de la introducción de los organismos en el túnel, la tasa metabólica disminuyó en forma gradual, después de algunas horas se estabilizó. La dispersión de datos en organismos los con deformación opercular bilateral fue mucho más evidente que en los organismos con malformación opercular monolateral que en los organismos sanos o normales. El metabolismo activo superior promedio fue mayor en organismos con deformación opercular bilateral ($429.50 \text{ mgO}_2\text{kg}^{-1}\text{h}^{-1}$), seguido de los organismos con deformación opercular monolateral ($377.52 \text{ mgO}_2\text{kg}^{-1}\text{h}^{-1}$) y por último los organismos sanos (358.10

$\text{mgO}_2\text{kg}^{-1}\text{h}^{-1}$). El metabolismo activo inferior promedio fue muy similar entre las tres condiciones (Figura 30), con la mayor diferencia entre los organismos sanos y aquellos con deformación opercular bilateral ($5.14 \text{ mgO}_2\text{kg}^{-1}\text{h}^{-1}$), en contraste, la mayor diferencia en el metabolismo activo superior promedio entre los juveniles de totoaba fue de $71.4 \text{ mgO}_2\text{kg}^{-1}\text{h}^{-1}$ (Tabla 8).

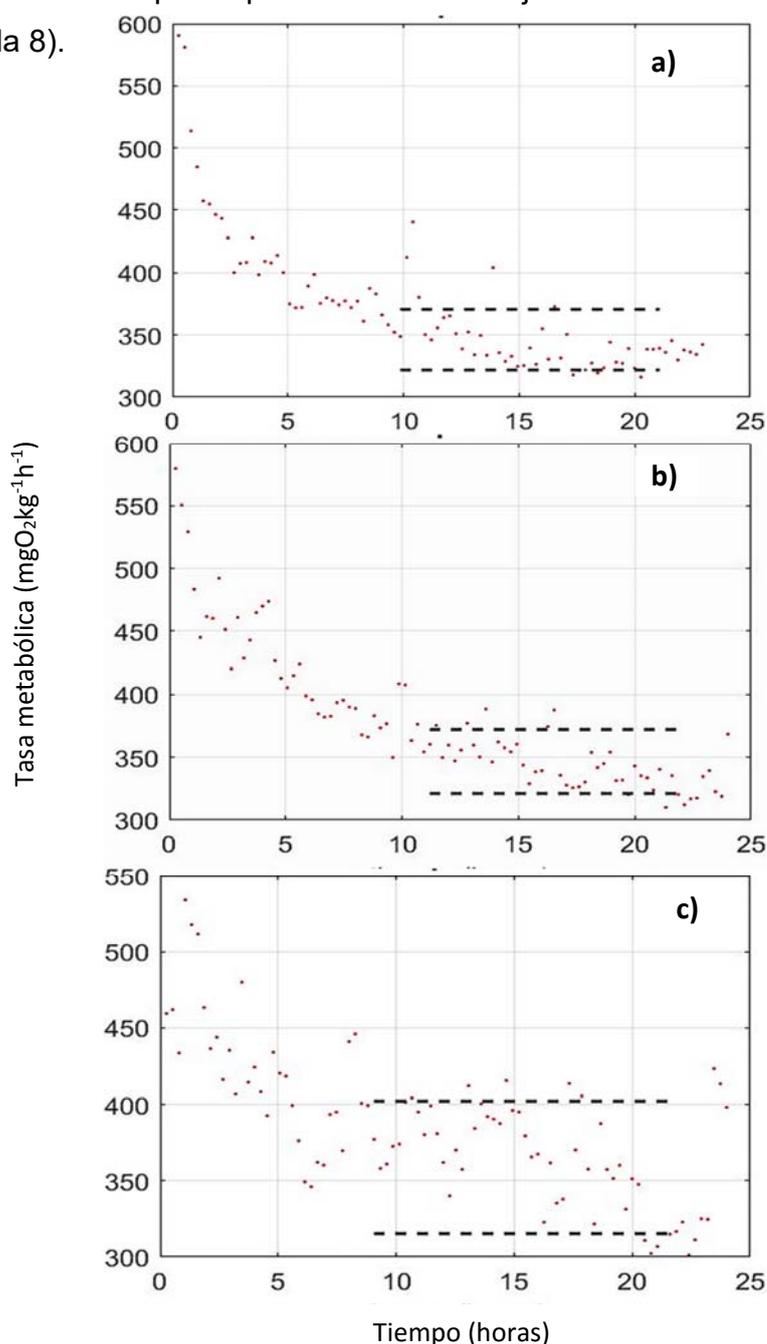


Figura 30.- Metabolismo activo promedio por condición de los juveniles de totoaba a) organismos sanos, b) organismos con malformación opercular monolateral, c) organismos con malformación opercular bilateral.

Tabla 8.-Tasa metabólica en condiciones de nado activo de juveniles de *Totoaba macdonaldi*, sanos, con malformación opercular monolateral (MOM) y bilateral (MOB).

Metabolismo activo $\text{mgO}_2\text{kg}^{-1}\text{h}^{-1}$			
	Superior	inferior	Diferencia
Sanos \bar{X}	358.10	315.83	42.27
MOM (\bar{X})	377.52	319.47	58.05
MOB (\bar{X})	429.50	320.97	108.53

Las medidas de la tasa metabólica activa superior e inferior siguieron una distribución normal, de acuerdo con la prueba de normalidad de Lilliefors, y también cumplieron con el supuesto de homogeneidad de varianzas (Prueba de Levene). Las diferencias significativas solo se encontraron entre en el metabolismo superior ($p=0.04$) de las tres condiciones, y mediante el análisis post hoc de Tukey (Figura 31) se encontró que las diferencias fueron entre el metabolismo superior de los organismos sanos y los organismos con deformación opercular bilateral.

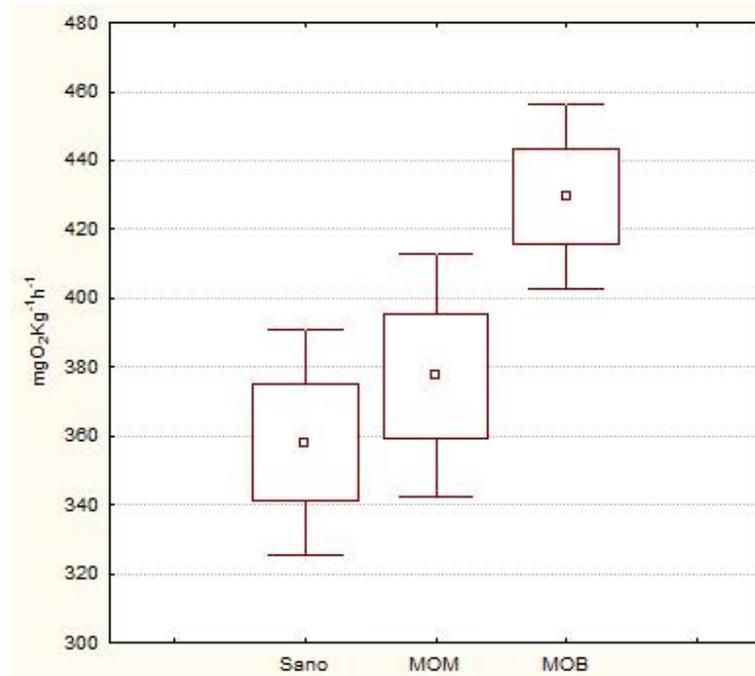


Figura 31.-Diagrama de cajas y bigotes resultantes del análisis de Tukey entre las tasas de consumo de oxígeno de juveniles de totoaba con malformaciones y sanos.

3.2.3 Concentración de eritrocitos y hematocrito (Ht)

La concentración promedio de eritrocitos fue mayor en los organismos sanos ($2.49 \pm 0.19 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$), seguida de los organismos con MOM ($2.43 \pm 0.48 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$) y por último los organismos con MOB ($2.37 \pm 0.22 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$). No se encontraron diferencias en la concentración de eritrocitos entre los tratamientos ($P=0.76$). Los valores máximos y mínimos se presentaron en los organismos sin un opérculo con valores de $3.6 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$ y $1.8 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$ respectivamente.

Los organismos con MOM tuvieron un mayor porcentaje de hematocrito, con un porcentaje promedio de $31.7 \pm 8.4 \%$, seguidos de los organismos sanos con $31.5 \pm 4.4 \%$ y por último los organismos con MOB, que tuvieron un valor promedio de $28.5 \pm 5.6 \%$, tampoco se encontraron diferencias entre los valores del hematocrito entre las tres condiciones ($p=0.53$) (Figura 32b).

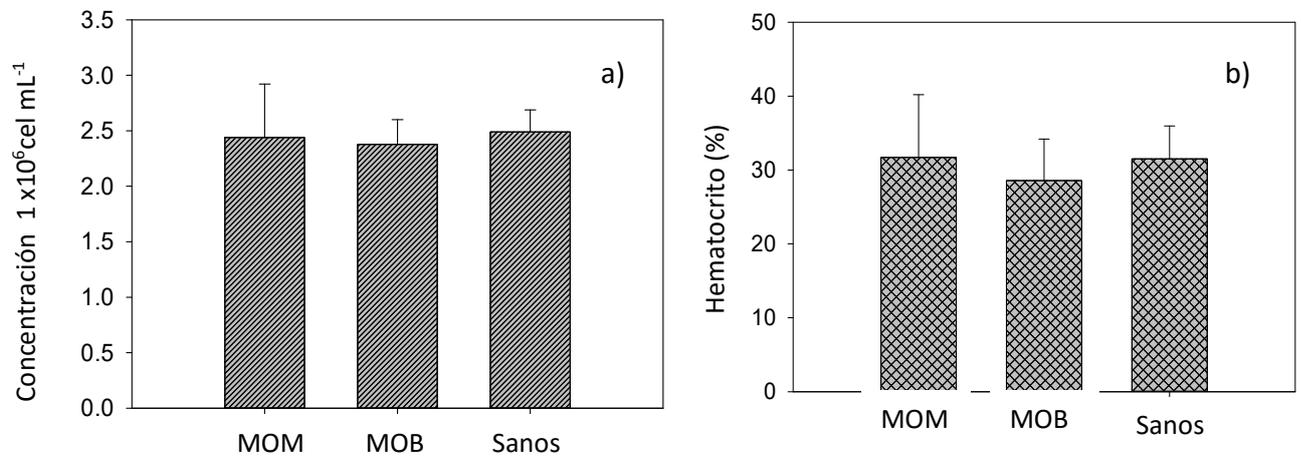


Figura 32.- Parámetros sanguíneos de *Totoaba macdonaldi*, a) concentración de eritrocitos, b) hematocrito.

Capítulo 4.-Discusión.

4.1 Fase A: Diagnóstico

4.1.1 Cultivo larval

El crecimiento larval observado en este estudio fue similar al reportado por Galaviz *et al.* (2015) para esta especie, en donde también se identificaron dos fases de crecimiento; la primera, que comprende desde la eclosión hasta el día 18 DDE (cuando se observa el notocordio flexionado) y se caracteriza por un lento crecimiento en longitud. La segunda fase, de crecimiento exponencial, de los 18 a los 40 DDE (final del experimento). En el presente trabajo estas fases de crecimiento lento y acelerado, se presentaron entre los 2 y 19 DDE y de los 19 a los 41 DDE (final del experimento), respectivamente.

La fase de lento crecimiento se puede relacionar con la capacidad limitada de la larva para digerir el alimento, ya que durante esta etapa del desarrollo se registran procesos de diferenciación celular e importantes cambios morfológicos, entre los cuales, uno de los más importantes es el desarrollo del tracto digestivo, a partir de los 17 DDE las larvas de totoaba poseen un sistema digestivo suficientemente desarrollado (Mata-Sotres *et al.*, 2015).

La maduración del tracto digestivo de las larvas de peces implica el desarrollo y diferenciación de distintos órganos y tejidos, como el intestino, la válvula intestinal, el páncreas y el hígado. La diferenciación del estómago es un evento tardío en el desarrollo del tracto digestivo y se caracteriza por la diferenciación de las glándulas gástricas y por la actividad de enzimas ácidas, como la pepsina. Los estudios histológicos, genéticos y enzimáticos en la totoaba, indican que el tracto digestivo es completamente funcional al día 24 DDE, ya que la actividad específica de pepsina ($0.20 \text{ U mg proteína}^{-1}$) y la diferenciación de glándulas gástricas y del estómago ocurren entre los días 18 y 19 DDE (Galaviz *et al.*, 2015). Estos eventos coinciden con la etapa de transición entre el crecimiento lento exponencial observado en las larvas de totoaba en este estudio.

4.1.2 Esqueletogénesis

El patrón de desarrollo y de osificación de las diferentes estructuras esqueléticas axiales y apendiculares fue similar al de otras especies de peces marinos como en *Lutjanus guttatus* (Rodríguez-Ibarra *et al.*, 2015), *Seriola dumerili* (Chen-Hsiang, 2001; Laggis *et al.*, 2010), y *Sparus aurata* (Faustino and Power, 1998). Los huesos que sirven de soporte para las aletas (pteriogioforos), inicialmente están formados por tejido cartilaginoso y subsecuentemente se osifican. Un patrón similar de desarrollo se observó en las vértebras y en las espinas neurales, aunque el proceso es gradual y sigue una dirección anteroposterior. *T. macdonaldi* tiene un total de 25 vértebras, un número mayor que otras especies estudiadas, *Lutjanus guttatus* tiene 21 vertebras, *Seriola dumerili* y *Sparus aurata* cuentan con 24.

Durante el desarrollo del esqueleto de *T. macdonaldi* se observaron distintos patrones de formación entre los diferentes elementos que lo conforman, algunos se desarrollaron en forma progresiva (e.g. en dirección anteroposterior), primero como cartílago y subsecuentemente se osificaron, siguiendo el mismo patrón progresivo de su desarrollo inicial, como en el caso muy claro de las espinas neurales y hemales, que primero se desarrollaron como estructuras cartilaginosas siguiendo un orden antero posterior y posteriormente se osificaron siguiendo el mismo patrón. Otros elementos del esqueleto, como los radios de las aletas, algunos huesos planos de la cabeza y las vértebras se formaron directamente como hueso. Otros elementos como los de la aleta pectoral y los arcos branquiales se desarrollan inicialmente como cartílago, pero su osificación es muy tardía. Estos patrones de osificación en peces se han descrito por Boglione *et al.* (2013) como osificación endocondral, pericondral e intramembranosa.

En la osificación endocondral y pericondral es necesaria la formación de cartílago, a partir del cual se desarrolla el proceso de osificación. La osificación endocondral se lleva a cabo desde el interior del elemento esquelético hacia el exterior y la osificación pericondral progresa desde el borde del elemento. La osificación intramembranosa difiere de las anteriores, ya que no se necesita la matriz de cartílago como precursor, sino que las células mesenquimales se diferencian como osteoblastos

que forman la pieza ósea sin la formación de osteocitos (Franz-Ondendaal *et al.*, 2006; Boglione *et al.*, 2013).

En *Totoaba macdonaldi*, las vértebras, los radios de todas las aletas, los radios branquiostegos y los opérculos muy probablemente se desarrollaron por osificación intramembranosa, mientras que los huesos hipurales de la aleta caudal, las espinas hemales y neurales y coracoide que iniciaron como cartílago presentan un patrón de osificación endocondral similar a lo reportado por Estêvão *et al.* (2011) en *Sparus aurata*. Algunos huesos de soporte de las aletas como basipterigio y lepidotriquios que también iniciaron como cartílago, se desarrollan típicamente a través de osificación pericondral (Boglione *et al.*, 2013b). Es importante resaltar que para poder identificar con exactitud el tipo de osificación es necesario realizar estudios histológicos de identificación y organización celular.

4.1.3 Anomalías del desarrollo.

El comportamiento de las larvas de permanecer nadando contra las paredes del tanque fue definido como “clinging behavior” en la especie *Sander vitreus* (Summerfelt, 1996), y como “Wall nosing” en *Seriola lalandi* (Cobcroft *et al.*, 2004). Este comportamiento es un problema común cuando el cultivo de larvas de peces se hace en aguas claras, y es una respuesta fototáctica innata, por la cual las larvas nadan hacia la luz. En los tanques de cultivo, la luz reflejada por las paredes del tanque atrae a las larvas, por lo que para reducir esta conducta se recomienda el uso de luz dispersa o de aguas turbias, las cuales ayudan en gran medida a dispersar la luz, además de que disminuyen el canibalismo, que también es una conducta innata común en muchas especies (Summerfelt, 1996). No obstante, la atracción de las larvas hacia las paredes del tanque de cultivo también puede ser el resultado de una disponibilidad reducida de alimento. El efecto de golpear constantemente contra las paredes del estanque ocasiona daño físico, especialmente en el cráneo (Cobcroft and Battaglen, 2009).

Las malformaciones óseas que se desarrollan durante el cultivo larvario se pueden atribuir a múltiples factores, incluyendo factores abióticos inapropiados como la luz, temperatura, flujo de agua y manipulación inadecuada, entre otros, así como a una nutrición inadecuada, como la alimentación con cantidades no apropiadas de ciertas vitaminas y ácidos grasos, aunque en algunos casos el factor genético no se debe de subestimar (Koumoundouros, 2010).

4.1.3.1 Malformaciones del notocordio

El notocordio es el primer tejido esquelético que le brinda soporte al embrión y a las larvas, además de la función de soporte, también participa en la señalización del patrón de desarrollo de la medula espinal y las somitas y da origen a la columna vertebral a través de un proceso de endurecimiento que involucra la secreción de fibras de colágeno sobre las que se desarrollará el tejido óseo (Sanatamaría *et al.*, 1994; Boglione *et al.*, 2013)

Aunque las malformaciones del notocordio no tienen un mismo origen y el proceso de deformación aún no se comprende del todo, se han estudiado diferentes factores teratogénicos, entre los cuales destaca la exposición a metales pesados, para los que se ha demostrado un efecto negativo en el notocordio, dentro de los más estudiados son el cadmio y cobre los cuales han provocado malformaciones principalmente del notocordio en distintas especies de peces expuestos a estos metales durante la etapa embrionaria. (Sfakianakis *et al.*, 2015).

El tipo de malformaciones observadas en larvas recién eclosionadas de la carpa común (*Cyprinus carpio*) (Jeziarska and Lugowska, 2000) en condiciones ambientales sin contaminantes y a 20°C son similares a las encontradas en las larvas de totoaba con malformación en el notocordio, sin embargo, la prevalencia de malformaciones en carpa fue menor (>10%) en comparación con la de totoaba (27.8%).

En condiciones de contaminación con cobre y plomo, se encontró una prevalencia de hasta un 38 y 24% respectivamente en las larvas de carpa común, lo cual es más cercano a la prevalencia encontrada en totoaba. Las malformaciones del notocordio en totoaba, también son similares a las documentadas por Andrades *et al.* (1996) en la dorada europea (*Sparus aurata*), al igual que la prevalencia con un 27% de organismos sin exposición a algún contaminante.

En un estudio más específico de las malformaciones del notocordio de *Sparus aurata* mediante histología, se encontró que involucraban alteraciones en el arreglo de los paquetes musculares y en la envoltura de colágeno del notocordio (Santamaría *et al.*, 1994). Dichas alteraciones se desarrollaron antes de que se osificara el tejido notocordal, proceso que coincidió con el inflado de la vejiga natatoria. Todos estos procesos morfogénéticos ocurrieron en la etapa lecitotrófica, por lo que las malformaciones se atribuyen a una anomalía del desarrollo embrionario y a alteraciones del metabolismo del colágeno. En el caso de totoaba se observaron embriones con deformación del notocordio algunos de los cuales murieron, y muchos otros terminaron su desarrollo embrionario hasta eclosionar produciendo larvas deformes, los días subsiguientes a la eclosión se observó gran mortalidad de larvas deformes similar a lo descrito por Andrades *et al.*(1996).

Otro factor asociado a la deformación del notocordio en larvas recién eclosionadas se ha atribuido al transporte. Los huevos de totoaba que se utilizaron en este estudio se transportaron durante varias horas (>10 h) del laboratorio de reproducción (CREMES), hasta las instalaciones del laboratorio de peces marinos.

En *Chanos* el proceso de recolección de huevos y su transporte es común y puede provocar bajas tasas de eclosión y daños en los embriones, así como malformaciones en las larvas, sin embargo, largos periodos de estabilidad o falta de movimiento en el agua provoca altas mortalidades en embriones e incrementa el porcentaje de malformación, lo que podría estar asociado con la disponibilidad de oxígeno para los huevos (Hilomen-García, 1998).

4.1.3.2 Inflado de la vejiga natatoria

El inflado de la vejiga natatoria en los peces fisoclistos, como es el caso de la mayoría de peces marinos, se lleva a cabo en dos etapas, en la primera, las larvas tienen que engullir burbujas de aire de la superficie, las cuales son fraccionadas por una sustancia surfactante producida en el intestino anterior y pasan a través del conducto neumático hasta ser depositadas en la vejiga gaseosa, la cual durante esta etapa tiene una forma esférica (Figura 33). En la segunda etapa de inflado interviene la glándula de gas, situada en la parte ventral de la vejiga, lo que incrementa la presión de la vejiga gaseosa, hasta alcanzar una forma elongada (Summerfelt, 1996).

La etapa inicial de inflado de la vejiga en las larvas de totoaba de los tres lotes de huevos cultivados fue evidente entre los 4 y 5 DDE. Las anomalías en el inflado de la vejiga gaseosa de las larvas cultivadas durante el segundo año, pudo tener un origen multifactorial. Entre los factores más comunes están la presencia de películas lipídicas en la superficie del agua, que impiden el rompimiento de la superficie y el engullimiento de la primera burbuja de aire, necesaria para el inicio del proceso de inflado de la vejiga. También se ha observado que durante la segunda etapa de inflado, la vejiga se puede atrofiar por la contaminación bacteriana provenientes de la superficie del agua que ocasiona aerocistitis (inflamación de la vejiga natatoria), dando paso a una disfunción de la vejiga o a la pérdida del gas insuflado durante la primer etapa (Summerfelt, 1996). Las anomalías observadas en este trabajo se pueden correlacionar



Figura 33.-Larva de *Totoaba macdonaldi* de 5DDE con el primordio de la vejiga gaseosa.

con este último proceso, ya que los signos de falta de flotabilidad se observaron hasta los días de 25 al 28 DDE.

En el cultivo de larvas del primer año, el comportamiento y síntomas que se observaron entre los 27 y 29 DDE correspondieron al hiperinflado de la vejiga natatoria, muy similares a los observados en *Lota lota* (Rekecki *et al.*, 2016), cuyas características principales fueron la flotación de las larvas en la superficie con el abdomen distendido, lo que les impidió nadar normalmente y capturar presas para alimentarse, un análisis bacteriológico y genético del epitelio de la vejiga gaseosa en *Lota lota* permitió diagnosticar una infección ocasionada por *Vibrio anguillarum* en (Rekecki *et al.*, 2016).

4.1.3.3 Malformaciones de la columna

La deformación de la columna vertebral que se observó en las totoabas cultivadas en 2015 consistió en dos cifosis, una en la región cefálica y otra en la región caudal, la cual se presentó asociada a un proceso de hiperinflación de la vejiga natatoria. Boglione *et al.* (2013) Mencionan que este tipo de anomalías no son comunes en los juveniles de *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata* cultivados, el hecho que no reporten estas malformaciones puede deberse a que la evaluación de malformaciones en estas dos especies se realizó en juveniles por lo que los organismos con presencia de una severa deformación del esqueleto axial en etapas tempranas, por lo general, mueren de inanición al no ser capaces de capturar alimento.

En otro estudio con *Dicentrarchus labrax*, se observó una incidencia de cifosis del 24.8% a los 45 DDE, del total de los organismos muertos en los días subsecuentes, el mayor porcentaje fue de peces con cifosis, por lo que el porcentaje de malformación se redujo a un 7.7% (Koumoundouros *et al.*, 2002). La mortalidad diferencial entre organismos sanos y deformes puede explicar la aparente ausencia de malformación en las etapas juveniles de *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata* observadas por Boglione *et al.* (2013).

Las malformaciones por cifosis en la totoaba se observaron entre los días 27 y 29 DDE, con una longitud promedio de 10.02 ± 1.50 mm. En *Dicentrarchus labrax*, la primer evidencia de cifosis se observó en organismos de 10 mm de longitud total (Koumoundouros *et al.*, 2002). Trotter *et al.* (2001) mencionan que en *Latrix lineata* la cifosis se observó en casos extremos de malformación de la vejiga gaseosa. Es posible que en la totoaba los problemas de inflado de la vejiga gaseosa tuvieran un efecto importante en el desarrollo de cifosis, ya que todos los organismos con problemas de flotabilidad tenían cifosis. No obstante, otros factores como el nutricional también podrían contribuir al desarrollo de esta malformación.

Kjørsvik *et al.* (2009) observaron una prevalencia de cifosis cervical del 11% en las larvas de *Gadus morhua* de 45DDE, esta malformación es similar a la encontrada en *T. macdonaldi*, La alimentación de las larvas de *G. morhua* con alimentos microparticulados con inclusión de DHA (ácido docosahexaenoico) y EPA (ácido eicosapentaenoico) en la fracción de fosfolípidos o en lípidos neutros, no propició una diferencia en la incidencia de cifosis, por lo que estas malformaciones no se atribuyeron a algún factor nutricional. La exposición de las larvas de *G. morhua* a una fuerza mecánica anormal puede ocasionar la deformación de las vértebras cervicales, ya que el notocordio se expone a una fuerza mecánica excesiva, probablemente generada por la presión de la vejiga natatoria durante el proceso de desarrollo y osificación de las vértebras (Grotmol *et al.*, 2005).

4.1.3.4 Malformaciones operculares

En las larvas de *Dicentrarchus labrax* la edad más temprana en la que se pudieron identificar las malformaciones operculares fueron a los 17 y 19 DDE, a esta edad también se observó la etapa de preflexión y flexión del notocordio (Koumoundouros, 2010). En la dorada, la detección más temprana de esta malformación fue a los 40 DDE, cuando los organismos tenían una longitud de 8 mm y el opérculo aún no estaba completamente osificado (Verhaegen *et al.*, 2007). La

diferencia en tiempo de la aparición de dichas malformaciones puede deberse a la diferencia en el desarrollo ontogénico de cada especie.

En *Totoaba macdonaldi*, las malformaciones del opérculo se pudieron observar de manera similar a *D. labrax* entre los 17 y 19 DDE, la observación se hizo en vivo con la ayuda de un microscopio, posteriormente se pudo corroborar la malformación mediante la técnica de doble tinción o análisis histológicos. La detección temprana de las malformaciones en la producción comercial es poco práctica, ya que requiere de personal entrenado (Verhaegen *et al.*, 2007), por lo que para fines prácticos el diagnóstico de la prevalencia de malformaciones operculares se puede hacer en estadios más avanzados, como a los 33 DDE, cuando las malformaciones operculares son evidentes a simple vista y los organismos anormales pueden ser removidos manualmente.

Las malformaciones operculares se han estudiado ampliamente, ya que son de las más comunes en los peces marinos cultivados. Su origen se ha atribuido a diversos factores, como a la deficiencia de ácidos grasos (Gapasin and Duray, 2001), temperatura (Abdel *et al.*, 2004; Georgakopoulou *et al.*, 2010), deficiencia de vitamina C (Chávez de Martínez, 1990), contaminación (Lindesjö *et al.*, 1994) y daño mecánico (Cobcroft and Battaglione, 2009).

En el cultivo del año 2016-2, se cuantificó un menor porcentaje de organismos con malformaciones, incluyendo la malformación opercular, que fue la más importante. Esta disminución en la prevalencia de malformaciones puede tener diferentes explicaciones, sin embargo, existieron dos factores diferentes con respecto a los cultivos anteriores: un evento de infección con *Amylodinium* que ocasionó una muerte masiva; y las condiciones de iluminación en el tanque, ya que se redujo la intensidad de luz en el tanque de cultivo larval.

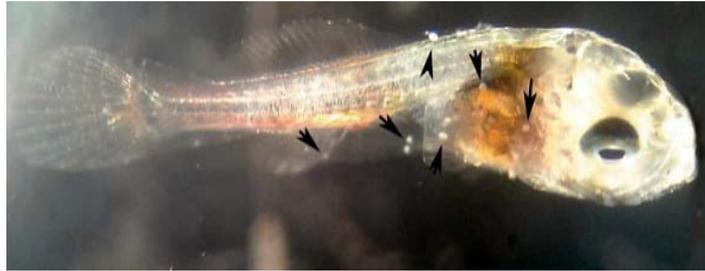


Figura 64. Larva de *Totoaba macdonaldi* parasitada con *Amyloodinium* sp. las flechas negras indican la ubicación de algunos parásitos.

Tucker (1998) menciona que de manera general, las larvas de peces marinos se cultivan en intensidades de luz que van desde uno hasta 11,000 lux y que se necesitan 10 lux al inicio de la alimentación exógena y que en algunas especies se necesita aún menos. En este trabajo, los tres cultivos se llevaron a cabo bajo condiciones de luz relativamente bajas (77.14-1142.12 lux), sin embargo, la menor intensidad de luz utilizada el año 2016-2 (10 veces menor que en las primeras dos producciones), produjo la menor cantidad de peces deformes.

La intensidad de luz inadecuada contribuye a que las larvas se agreguen y golpeen constantemente en las paredes del tanque, produciendo daño mecánico y malformaciones craneales, en especial de la mandíbula, como en *Latrix lineata* (Cobcroft and Battaglen, 2009) y de los opérculos, como en *Sparus aurata* (Galeotti et al., 1999). Es posible que la disminución en la intensidad de luz en el cultivo de *Totoaba macdonaldi* contribuyera a la disminución de malformaciones craneales. Amoroso et al.(2016) también mencionan que las malformaciones operculares se pueden deber a una relación entre los hábitos de alimentación y la agresividad de las larvas.

La infección con *Amyloodinium* también pudo contribuir a la disminución de la prevalencia de malformaciones operculares, ya que la exposición de las branquias predispone a los organismos a las infecciones (Koumoundouros, 2010; Boglione et al., 2013b). Esta deformación pudo ocasionar la muerte selectiva de aquellos organismos sin cobertura opercular (Noga, 2010), sin embargo, en larvas la infestación se ha reportado principalmente en la piel (Paperna, 1980) . La revisión de las larvas de

totoaba con y sin opérculos, confirmó que este parásito no afectó las branquias, pero la intensidad de la infestación fue más severa en las aletas y el cuerpo. Cabe aclarar que no se hizo la cuantificación del número de organismos muertos con y sin opérculos, por lo que no es posible establecer una relación entre la infestación y la mortalidad de organismos normales y con malformaciones operculares.

Las malformaciones de mandíbula se desarrollaron en un pequeño porcentaje del total de los organismos deformes, y se presentaron en la mandíbula inferior, por lo que estos organismos mantenían la boca abierta y para alimentarse tenían que tomar el alimento de la superficie y sumergirse para poder tragarlo. Este tipo de malformación también se ha observado en *Oncorhynchus tshawytscha* y se ha denominado “opern-jaw syndrome” o síndrome de la mandíbula abierta (Crouch *et al.*, 1973).

4.1.3.5 Prevalencia de malformaciones en juveniles

El porcentaje de deformación promedio en las totoabas de los tres cultivos fue del 23.05% y está comprendido en el intervalo mencionado por True (2012) para esta especie. En este trabajo, se observó una diferencia entre los tres lotes cultivados lo que confirma que la prevalencia de malformaciones es muy variable entre especies y entre condiciones de cultivo. Estas variaciones pueden ocurrir incluso con la misma especie entre diferentes centros de producción y también entre diferentes lotes (Boglione *et al.*, 2013), por lo que es difícil hacer comparaciones entre diferentes especies, sin embargo el porcentaje de malformaciones en el cultivo de totoabas es relativamente bajo, ya que se han reportado una prevalencia de malformaciones de hasta el 95% en *Latrix lineata* y hasta un 70% en *Seriola lalandi* (Cobcroft and Battaglione, 2013). Estas malformaciones pueden representar grandes pérdidas económicas en la producción comercial, por lo que su estudio es fundamental para entenderlas y para reducirlas al mínimo.

4.2 Fase B: Desempeño biológico

4.2.1 Cultivo de juveniles deformes y sanos

4.2.1.1 Crecimiento

De manera general, los parámetros de crecimiento en organismos de las tres condiciones (sanos, MOM, MOB) fueron similares o mejores que los reportados en otros trabajos en donde se han cultivado juveniles de totoaba. Minjarez-Osorio *et al.* (2012) cultivaron totoabas de 74.7 ± 0.5 g, a una densidad inicial de 1.86 gL^{-1} , con un alimento de 55% de proteína y calcularon una tasa específica de crecimiento del 1.8 en un tiempo de cultivo de 56 días. En este estudio la tasa de crecimiento específica, utilizando un alimento similar (55% de proteína), para un periodo similar fue mayor (sanos=4.17, MOM=4.05, MOB=3.95), sin embargo, la densidad de cultivo inicial fue 3.3 veces menor y peso inicial fue 11 veces menor.

Espinosa-Chaurand *et al.* (2015) evaluaron el efecto de la alimentación de totoabas con dietas isoprotéicas e isolipídicas, elaboradas con harina de cabezas de camarón (55.5%, 15%), durante 57 días. Los autores mencionan que con el mejor tratamiento (sustitución del 30% de harina de pescado por harina de cabezas de camarón) la tasa de crecimiento fue menor que la obtenida por Minjarez-Osorio *et al.* (2012), pero la tasa de conversión alimenticia fue menor (1.6). Este menor crecimiento también se puede relacionar con las características de las totoabas al inicio del cultivo, ya que su peso inicial y la temperatura fueron menores (26.5 g y 20.5°C respectivamente) y la densidad de cultivo de 26.3 g L^{-1} .

La tasa de conversión alimenticia cuantificada en este estudio (sanos= 0.6 ± 0.09 , MOM= 0.59 ± 0.1 , MOB= 0.59 ± 0.08) fue similar a la descrita por Rueda-López *et al.* (2011) para juveniles de totoaba (0.7 ± 0.01) alimentados con una dieta de 52% de proteína y 8% de lípidos, bajo condiciones de densidad inicial (0.48 g L^{-1}) y temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) similares a los del presente trabajo, sin embargo, la tasa de crecimiento específica fue menor (2.5 ± 0.01) en comparación con las totoabas sanas (sin malformación), MOM Y MOB (4.17 ± 0.05). Lo antes mencionado puede deberse a que la talla inicial de los organismos cultivados por Rueda-López *et al.* (2011) fue prácticamente el doble (12.12 ± 0.09).

4.2.1.2 Malformaciones de la columna vertebral

El proceso de deformación de la columna en los juveniles de totoaba fue similar al observado en *Pagrus major* por Kitajima *et al.* (1981), ya que se observaron organismos con lordosis hasta el día 40 DDE y el porcentaje de deformación aumentó hasta alcanzar un 90% al día 120 DDE. Estos eventos de lordosis fueron causados por fallas en el inflado de la vejiga gaseosa.

4.2.1.3.-Remodelación de opérculos

Durante el cultivo de los juveniles de totoaba, se observó que en algunos ejemplares que carecían de un opérculo, se regeneró. Un proceso similar se observó en *Sparus aurata*, después de 16 meses de cultivo el 61% de los organismos con malformación opercular monolateral se recuperaron (Beraldo and Canavese, 2011).

Amoroso *et al.* (2016) también observaron una recuperación de los opérculos de hasta el 99% en *Salmo salar*, aunque el grado de malformación era leve, principalmente por acortamiento del opérculo.

En el presente trabajo, la recuperación opercular fue mucho menor que en los trabajos mencionados (máximo de 17% en MOB), sin embargo es un evento sin precedente en *Totoaba macdonaldi*. Es necesario el desarrollo de más estudios para identificar los factores que propician tal recuperación, ya que tanto en *Sparus aurata* como en *Salmo salar*, no se probaron factores de recuperación, sin embargo, los autores mencionan que la edad del organismos, temperatura en primera instancia. La luz y la densidad del cultivo en forma secundaria, pueden contribuir a la regeneración opercular.

La importancia de conocer con precisión los factores que propician la recuperación y el momento en el desarrollo en que ocurre, es importante, ya que permite definir el momento en el que es más conveniente la eliminación de aquellos organismos deformes y que no recuperaran su estado “normal”, lo que puede contribuir a reducir los costos de producción.

4.2.2 Metabolismo activo

En el metabolismo activo de juveniles de totoaba deformes y sanos, se observó una mayor dispersión de los datos en organismos con malformación bilateral, en comparación con los peces sanos y con malformación mono lateral. Holker (2003) estudió el efecto del tamaño y la temperatura en el metabolismo de *Rutilus rutilus* y refiere que aquellos valores del metabolismo por encima de la banda definida como metabolismo de rutina, son el resultado de movimientos espontáneos o periodos pequeños de mayor actividad.

De la misma manera, Herrmann y Enders (2000) mencionan que estos incrementos en la tasa metabólica, son el resultado de algún tipo de estrés en el organismo, que causa movimientos espontáneos. Por esta razón, algunos autores como Fry (1971), mencionan que para poder entender el comportamiento en el metabolismo de los peces, es necesario monitorear el movimiento de los organismos dentro de la cámara de medición para poder asociar las tasas metabólicas con eventos de mayor o menor actividad.

En el presente trabajo no se hizo una medición sistemática de la actividad de los peces dentro de la cámara metabólica, sin embargo, si se observaron algunos periodos de mayor o menor actividad durante el tiempo de medición de cada organismo, por lo que la mayor dispersión de las tasa metabólicas en los peces con deformación opercular bilateral pueden corresponder a momentos de mayor actividad dentro de la cámara, provocado por algún factor estresante.

Es posible que el mayor nivel de actividad de los organismos con malformación opercular bilateral tenga distintos orígenes. Lijalad y Powell (2009a) estudiaron el efecto de la deformación de la mandíbula inferior de salmones diploides y triploides sobre su capacidad de natación aeróbica, y mencionan la posibilidad de que los organismos con deformación de la mandíbula inferior puedan recurrir a utilizar la respiración ram como una estrategia para compensar el funcionamiento deficiente de la cámara bucal, que es necesaria para la correcta irrigación de las branquias con agua rica en oxígeno.

Los peces que utilizan la respiración ram no utilizan las cámaras opercular y bucal para ventilar las branquias, solo es necesario que mantengan la boca abierta mientras nadan, para que el agua circule a través de sus branquias. Esta forma de ventilar las branquias es eficiente para los peces que se mantienen nadando de forma continua, como los atunes y la sardinas, por lo que el trabajo de ventilación depende de los músculos involucrados en la natación y no de los músculos que mueven la boca y los opérculos (Helfman *et al.*, 2009)

Roberts (1975), menciona que el uso de la ventilación ram es ampliamente utilizada por otros peces que no se consideran de natación rápida o de nado continuo, la transición entre la respiración de bombeo activo (que depende de la bomba bucal y opercular) y la respiración ram, depende principalmente de la velocidad de nado.

En algunas especies en las que se ha evaluado el cambio de respiración bucal opercular a respiración ram son *Morone saxatilis* y *Pomatomus saltatrix* encontrando que estos peces tienen estrategias de ventilación facultativa y la transición de ventilación de bombeo de la cámara branquial y opercular a ram tiene efecto en el consumo de oxígeno y es dependiente de la velocidad de nado (Freadman, 1981).

Aunque diversos autores mencionan que la respiración ram es eficiente y reduce el gasto de energía, hay que considerar que durante la respiración ram los músculos necesarios para la ventilación y para la natación no permanecen relajados, ya que la apertura de la boca tiene que ser regulada continuamente, aunque el costo energético de estos procesos puede ser en algunos casos despreciables (Freadman, 1981;

Roberts, 1975). En el caso de *Totoaba macdonaldi* con malformaciones operculares, el incremento en la tasa metabólica, puede ser el resultado del costo energético asociado a la natación necesaria para mantener irrigadas las branquias por ventilación ram, o a una etapa intermedia entre ventilación de bombeo activo y ventilación ram.

Esta posible adaptación en organismos con malformación opercular bilateral referente al nado y tipo de ventilación en compensación de su limitada capacidad de ventilación utilizando la cámara bucal y opercular puede ser comparada con las estrategias de algunos peces amazónicos bajo condiciones de hipoxia, Soares *et al.* (2006) reportaron diez especies de peces que recurren a nado superficial bajo condiciones de hipoxia, lo que implica una estrategia de comportamiento. También reportan dos especies que presentan alta tolerancia a condiciones de hipoxia por adaptaciones fisiológicas, que en este caso se abordó con el análisis de dos parámetros sanguíneos.

4.2.3 Análisis de sangre

Al comprar la concentración de eritrocitos y el hematocrito entre los organismos deformes y sanos, no se observaron diferencias significativas. Bañuelos-Vargas *et al.* (2014) cultivaron juveniles de *Totoaba macdonaldi* a una temperatura similar (23.5°C) y con una dieta de 55% de proteína y encontraron porcentajes de hematocrito de 29.9% y concentraciones de eritrocitos 2.88×10^6 células por mililitro; estos valores son similares a los observados en la presente investigación con la misma especie y específicamente en los organismos en los organismos sanos ($31.5 \pm 4.4\%$ de hematocrito y 2.49 ± 0.19 células por mililitro). En la curvina blanca (*Atractosion nobilis*), otra especie de la familia Sciaenidae, se reportan concentraciones de eritrocitos de 2.9×10^6 cél ml⁻¹ y porcentajes de hematocrito de 27.8 % en organismos juveniles alimentados con una dieta de 50% de proteína y 18% de lípidos provenientes de harina y aceite de pescado (Perez, 2012).

Aunque no se encontraron indicios de algún efecto de las malformación en estos dos parámetros sanguíneos (conteo de eritrocitos y hematocrito) existen otros

parámetros sanguíneos que se pueden alterar bajo condiciones de deficiencia de oxígeno en el medio tales como cambios en el volumen de eritrocitos, incremento en la concentración de pigmentos respiratorios como la hemoglobina y cambios en la afinidad por el oxígeno (Hochachka, 2002), por lo que el efecto de las malformaciones sobre las respuestas hematológicas no debe ser descartado.

Capítulo 5 Conclusiones

- El proceso de osificación en *Totoaba macdonaldi* es similar al de otras especies de peces marinos de peces cultivados, a los 35 DDE el esqueleto está osificado.
- El porcentaje de malformaciones en las totoabas cultivadas en el CICESE es del 23.05%, de las cuales las malformaciones operculares son las más comunes, con un 86.9% de los organismos deformes, el resto corresponden a otras malformaciones del esqueleto axial y apendicular.
- Las malformaciones operculares en *Totoaba macdonaldi* se pueden observar en una etapa temprana del desarrollo larval y consiste en la flexión del borde del opérculo hacia el interior de la cavidad branquial y su detección se puede hacer entre los 17 y 19 DDE, edad en la que los opérculos ya se encuentran osificados.
- Las malformaciones operculares no afectan el desempeño biológico en condiciones de cultivo en términos de crecimiento y parámetros hematológicos, a diferencia del metabolismo activo en donde se encontró un incremento en los organismos con malformación opercular bilateral.

Recomendaciones

- Hacer cortes histológicos de las diferentes estructuras óseas durante el desarrollo larval de *T. macdonaldi* para saber con exactitud su tipo de osificación.
- Medir el la velocidad critica de nado de organismos con malformaciones operculares y sanos, para saber el efecto de dichas malformaciones en su capacidad natatoria.
- Incrementar el número de ejemplares por condición ($x > 3$) en la medición de metabolismo activo y monitorear la actividad de los peces durante la medición.
- Hacer el cultivo de juveniles con malformaciones y sanos durante más de dos meses para probar si existe algún efecto en el crecimiento de las deformaciones operculares en periodos más largos.
- Explorar el efecto de las malformaciones operculares en otros parámetros hematológicos como volumen de eritrocitos, concentración de pigmentos respiratorios, capilaridad, entre otros.
- Probar el efecto de la intensidad lumínica en la prevalencia e intensidad de deformaciones craneales.

Listado de referencias bibliográficas

- Abdel, I., Abellán, E., López-Albors, O., Valdés, P., Nortes, M. J., and García-Alcázar, A. (2004). Abnormalities in the juvenile stage of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) reared at different temperatures: types, prevalence and effect on growth. *Aquaculture International*, 12, 523–538. Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/s10499-004-0349-9>
- Amoroso, G., Cobcroft, J. M., Adams, M. B., Ventura, T., and Carter, C. G. (2016). Concurrence of lower jaw skeletal anomalies in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and the effect on growth in freshwater. *Journal of Fish Diseases*, (Sadler 2000), 1–13. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/jfd.12492>
- Andrades, J.A., Becerra, J., Fernandez-Llebrez, P. (1996). Skeletal deformities in larval, juvenile, and adult stages of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 141(1996), 1–11. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01226-5](http://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01226-5)
- Bañuelos-Vargas, I., López, L. M., Pérez-Jiménez, A., and Peres, H. (2014). Effect of fishmeal replacement by soy protein concentrate with taurine supplementation on hepatic intermediary metabolism and antioxidant status of totoaba juveniles (*Totoaba macdonaldi*). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 170(1), 18–25. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.01.003>
- Basaran, F., Ozbilgin, H., and Ozbilgin, Y. D. (2007). Effect of lordosis on the swimming performance of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture Research*, 38(8), 870–876. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01741.x>
- Beraldo, P., and Canavese, B. (2011). Recovery of opercular anomalies in gilthead sea bream, *Sparus aurata* L.: Morphological and morphometric analysis. *Journal of Fish Diseases*, 34(1), 21–30. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01206.x>
- Boglione, C., Gavaia, P., Koumoundouros, G., Gisbert, E., Moren, M., Fontagné, S., and Witten, P. E. (2013a). Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 1: Normal and anomalous skeletogenic processes. *Reviews in Aquaculture*, 5, 99–120. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/raq.12015>
- Boglione, C., Gavaia, P., Koumoundouros, G., Gisbert, E., Moren, M., Fontagné, S., and Witten, P. E. (2013b). Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 1: Normal and anomalous skeletogenic processes. *Reviews in Aquaculture*, 5(SUPPL.1), 99–120. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/raq.12015>
- Boglione, C., Gisbert, E., Gavaia, P., Witten, P. E., Moren, M., Fontagné, S., and Koumoundouros, G. (2013). Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: Main typologies, occurrences and causative factors. *Reviews in Aquaculture*, 5(SUPPL.1), 121–167. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/raq.12016>

- Cahu, C., Infante, J. Z., and Takeuchi, T. (2003). Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture*, 227(1-4), 245–258. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00507-6](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00507-6)
- Cailliet, G. M., Love, M. S., and Ebeling, A. W. (1986). *Fishes: A Field and Laboratory Manual on Their Structure, Identification, and Natural History*. Waveland Press. Recuperado de: <https://books.google.com.mx/books?id=mHUWAQAAIAAJ>
- Chávez de Martínez, M. (1990). Vitamin C requirement of the Mexican native cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Gunther). *Aquaculture*, 86(4), 409–416. Recuperado de: [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90329-L](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(90)90329-L)
- Chen-Hsiang, L. (2001). Early osteological development of the yellow tail *Seriola dumerili* (Pisces: Carangidae). *Zoological Studies*, 40(4), 289–298.
- Cisneros-Mata, M.A., Montemayor-López G, Román-Rodríguez MJ.(1995). Life history and conservation of *Totoaba macdonaldi*. *Conservation Biology*. 9(4): 806–814
- Cobcroft, J. M., and Battaglione, S. C. (2009). Jaw malformation in striped trumpeter *Latris lineata* larvae linked to walling behaviour and tank colour. *Aquaculture*, 289(3-4), 274–282. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.12.018>
- Cobcroft, J. M., and Battaglione, S. C. (2013). Skeletal malformations in Australian marine finfish hatcheries. *Aquaculture*, 396-399(2013), 51–58. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.02.027>
- Cobcroft, J. M., Pankhurst, P. M., Poortenaar, C., Hickman, B., and Tait, M. (2004). Jaw malformation in cultured yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) larvae. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 38(1), 67–71. Recuperado de: <http://doi.org/10.1080/00288330.2004.9517218>
- Crouch, D. E., Yasutake, W. T., and Rucker, R. R. (1973). Open-jaw syndrome in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) at a hatchery. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 30(12), 1890–1892. Recuperado de: <http://doi.org/10.1139/f73-304>
- Darias, M. J., Lan Chow Wing, O., Cahu, C., Zambonino-Infante, J. L., and Mazurais, D. (2010). Double staining protocol for developing European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Journal of Applied Ichthyology*, 26, 280–285. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01421.x>
- de Silva, S. S., and Anderson, T. A. (1994). *Fish Nutrition in Aquaculture*. Springer Netherlands. Recuperado de: <https://books.google.com.mx/books?id=zCPvmeRx9mQC>
- Del Rio-Zaragoza, O. B., Fajer-Ávila, E. J., Almazán-Rueda, P., and Abdo de la Parra, M. I. (2011). Hematological characteristics of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) healthy and naturally infected by dactylogyrid monogeneans. *Tissue and Cell*, 43(3), 137–42. Recuperado

de:<http://doi.org/10.1016/j.tice.2011.01.002>

- Espinosa-chaurand, L. D., Silva-loera, A., García-esquivel, Z., López-acuña, L. M., Investigaciones, C. De, Cibnor, N., ... Box, P. O. (2015). Uso de harina de cabeza de camarón como reemplazo proteico de harina de pescado en dietas balanceadas para juveniles de *Totoaba macdonaldi* (Gilbert , 1890) juvenile of *Totoaba macdonaldi* (Gilbert , 1890), 43(3), 457–465. Recuperado de: <http://doi.org/10.3856/vol43-issue3-fulltext-7>
- Estêvão, M. D., Silva, N., Redruello, B., Costa, R., Gregório, S., Canário, A. V. M., and Power, D. M. (2011). Cellular morphology and markers of cartilage and bone in the marine teleost *Sparus auratus*. *Cell and Tissue Research*, 343(3), 619–635. Recuperado de:<http://doi.org/10.1007/s00441-010-1109-y>
- Faustino, M., and Power, D. M. (1998). Development of osteological structures in the sea bream : vertebral column and caudal fin complex. *Journal of Fish Biology*, 52, 11–22. Recuperado de:<http://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1998.tb01548.x>
- Fisk, D. M., Powell, M. D., and Nowak, B. F. (2002). The Effect of Amoebic Gill Disease and Hypoxia on Survival and Metabolic Rate of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 22(3), 193–194.
- Franz-Odendaal, T. A., Hall, B. K., and Witten, P. E. (2006). Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. *Developmental Dynamics*, 235(1), 176–190. Recuperado de: <http://doi.org/10.1002/dvdy.20603>
- Freadman, M. a. (1981). Swimming Energetics of Striped Bass (*Morone Saxatilis*) and Bluefish (*Pomatomus Saltatrix*): Hydrodynamic Correlates of Locomotion and Gill Ventilation. *The Journal of Experimental Biology*, 90, 253–265. Recuperado de: jeb.biologists.org/cgi/reprint/90/1/253.pdf
- Fry, F. E. J. (1971). Effect of environmental factors on the physiology of fishes. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 30(2), 152–153. Recuperado de:[http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)82982-1](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)82982-1)
- Galaviz, M. A., López, L. M., García Gasca, A., Álvarez González, C. A., True, C. D., and Gisbert, E. (2015). Digestive system development and study of acid and alkaline protease digestive capacities using biochemical and molecular approaches in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(5), 1117–1130. Recuperado de:<http://doi.org/10.1007/s10695-015-0073-6>
- Galaviz M. A., Lopez L.M., True C.D., Sandoval G., A. A. c. (2013). Expression and activity of three digestive proteases in larvae of totoaba (*Totoaba macdonaldi*). *European Aquaculture Society*, 20(Xx).
- Galeotti, M., Beraldo, P., De Dominis, S., D'Angelo, L., Ballestrazzi, R., Musetti, R., ... Pinosa, M. (1999). Histological and ultrastructural study of opercular anomalies in gilthead sea bream larvae (*Sparus aurata*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 19(3), 123–126. Recuperado de:

<http://doi.org/10.1023/A:1007883008076>

- Gapasin, R. S. J., and Duray, M. N. (2001). Effects of DHA-enriched live food on growth, survival and incidence of opercular deformities in milkfish (*Chanos chanos*). *Aquaculture*, 193, 49–63. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00469-5](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00469-5)
- Gavaia, P. j., Sarasquete, C., and Cancela, M. L. (2000). Detection of Mineralized Structures in Early Stages of Development of Marine *Teleostei* Using a Modified Alcian Blue-Alizarin Red Double Staining Technique for Bone and Cartilage. *Biotechnic and Histochemistry*, 75(2), 79–84. Recuperado de:<http://doi.org/10.3109/10520290009064151>
- Georgakopoulou, E., Katharios, P., Divanach, P., and Koumoundouros, G. (2010). Effect of temperature on the development of skeletal deformities in Gilthead seabream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, 308(1-2), 13–19. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.08.006>
- Grotmol, S., Kryvi, H., and Totland, G. K. (2005). Deformation of the notochord by pressure from the swim bladder may cause malformation of the vertebral column in cultured Atlantic cod *Gadus morhua* larvae: A case study. *Diseases of Aquatic Organisms*, 65(2), 121–128. Recuperado de: <http://doi.org/10.3354/dao065121>
- Helfman, G. S., Collette, B. B., Facey, D. E., and Bowen, B. W. (2009). *The diversity of fishes: biology, evolution, and ecology. Atlantic* (second, Vol. Second). Recuperado de:http://doi.org/10.1007/978-1-4615-2664-3_1
- Herrmann, J. P., and Enders, E. C. (2000). Effect of body size on the standard metabolism of horse mackerel. *Journal of Fish Biology*, 57, 746–760. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2000.tb00272.x>
- Hilomen-Garcia, G. V. (1998). Sensitivity of fertilized milkfish (*Chanos chanos* Forsskal) eggs to mechanical shock and simulated transport. *Aquaculture*, 159(3-4), 239–247. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00235-4](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00235-4)
- Hilomen-Garcia, G. V. (1997). Morphological abnormalities in hatchery-bred milkfish (*Chanos chanos* Forsskal) fry and juveniles. *Aquaculture*, 152(1-4), 155–166. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01518-9](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01518-9)
- Hochachka P.W., S. G. . (2002). Biochemical Adaptation: Mechanism and process in physiological evolution. Functional Metabolism. New York: Oxford university. Recuperado de:<http://doi.org/10.1002/047167558X.ch14>
- Holker, F. (2003). The metabolic rate of roach in relation to body size and temperature. *Journal of Fish Biology*, 62(3), 565–579. Recuperado de: <http://doi.org/10.1046/j.0022-1112.2003.00048.x>
- Jeziarska, B., and Lugowska, K. (2000). Malformations of newly hatched common carp larvae. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 3(2). Recuperado de:

<http://www.ejpau.media.pl/articles/volume3/issue2/fisheries/art-01.pdf>

- Kitajima, C., Tsukashima, Y., Fujita, S., Watanabe, T., And Yone, Y. (1981). Relationship between Uninflated Swim Bladders and Lordotic Deformity in Hatchery-reared Red sea Bream *Pagrus major*. *Nippon suisan gakkaiishi*, 47(10), 1289–1294. Recuperado de: <http://doi.org/10.2331/suisan.47.1289>
- Kjørsvik, E., Olsen, C., Wold, P., Hoehne-reitan, K., Cahu, C. L., Rainuzzo, J., ... Olsen, Y. (2009). Comparison of dietary phospholipids and neutral lipids on skeletal development and fatty acid composition in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, 294(3-4), 246–255. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.06.012>
- Koumoundouros, G. (1997). The opercular complex deformity in intensive gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larviculture. Moment of apparition and description. *Aquaculture*, 156, 165–177.
- Koumoundouros, G. (2010). 5 . Morpho-anatomical abnormalities in Mediterranean marine aquaculture. *Recent Advances in Aquaculture Research*, 661(2), 125–148.
- Koumoundouros, G., Maingot, E., Divanach, P., and Kentouri, M. (2002). Kyphosis in reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): ontogeny and effects on mortality, 209, 49–58.
- Laggis, A., Sfakianakis, D. G., Divanach, P., and Kentouri, M. (2010). Ontogeny of the body skeleton in *Seriola dumerili* (Risso, 1810). *Italian Journal of Zoology*, 77(3), 303–315. Recuperado de: <http://doi.org/10.1080/11250000903170870>
- Li, D., Fu, C., Wang, Y., Zhu, Z., and Hu, W. (2011). The hematological response to exhaustive exercise in “all-fish” growth hormone transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*, 311(1-4), 263–268. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.12.002>
- Lijalad, M., and Powell, M. D. (2009a). Effects of lower jaw deformity on swimming performance and recovery from exhaustive exercise in triploid and diploid Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Aquaculture*, 290(1-2), 145–154. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.01.039>
- Lijalad, M., and Powell, M. D. (2009b). Effects of lower jaw deformity on swimming performance and recovery from exhaustive exercise in triploid and diploid Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Aquaculture*, 290(1-2), 145–154. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.01.039>
- Lindesjö, E., Thulin, J., Bengtsson, B.-E., and Tjärnlund, U. (1994). Abnormalities of a gill cover bone, the operculum, in perch *Perca fluviatilis* from a pulp mill effluent area. *Aquatic Toxicology*, 28(3), 189–207. Recuperado de: [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0166-445X\(94\)90033-7](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0166-445X(94)90033-7)

- Ma, Z., Zheng, P., Guo, H., Zhang, N., Jiang, S., Zhang, D., and Qin, J. G. (2016). Jaw malformation of hatchery reared golden pompano *Trachinotus ovatus* (Linnaeus 1758) larvae. *Aquaculture Research*, 47(4), 1141–1149. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/are.12569>
- Mata-Sotres, J. a., Lazo, J. P., and Baron-Sevilla, B. (2015). Effect of age on weaning success in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) larval culture. *Aquaculture*, 437, 292–296. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.11.037>
- Minjarez-Osorio, C., González-Félix, M. L., and Perez-Velazquez, M. (2012). Biological performance of *Totoaba macdonaldi* in response to dietary protein level. *Aquaculture*, 362-363, 50–54. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.07.028>
- Nakashima E.,(1916).Notes on the totuava (*Cynoscion macdonaldi* Gilbert) in: Cisneros-Mata, M.A., Montemayor-López G, Román-Rodríguez MJ.(1995). Life history and conservation of *Totoaba macdonaldi*.*Conservation Bioogyl*. 9(4): 806–814
- Noga, E. J. (2010). *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*, Second Edition. North. Recuperado de: <http://doi.org/10.1002/9781118786758>
- Paperna, I. (1980). *Amyloodinium ocellatum* (Brown, 1931) (Dinoflagellida) infestations in cultured marine fish at Eilat, Red Sea: epizootiology and pathology. *Journal of Fish Diseases*, 3(5), 363–372. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1980.tb00421.x>
- Perez, E. vizcaino. (2012). Efecto de la concentracion de aceite de linaza en la dieta, sobre el crecimiento, composicion proximal, respuesta hematologica y quimica sanguinea en juveniles de corvina blanca *Atractoscion nobilis*. Universidad Autonoma de Baja california.
- Plaut, I. (2001). Critical swimming speed: Its ecological relevance. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 131(1), 41–50. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/S1095-6433\(01\)00462-7](http://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00462-7)
- Powell, M. D., Speare, D. J., Daley, J., and Lovy, J. (2005). Differences in metabolic response to Loma salmonae infection in juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and brook trout *Salvelinus fontinalis*, 67, 233–237.
- Rekecki, A., Meeus, W., Chiers, K., Adriaen, J., Boyen, F., Declercq, A., Decostere, A. (2016). Swimbladder hyperinflation in burbot *Lota lota* L. larvae. *Aquaculture Research*, 47(2), 673–676. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/are.12499>
- Roberts, H. E., and Smith, S. A. (2011). Disorders of the Respiratory System in Pet and Ornamental Fish. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice*, 14(2), 179–206. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.cvex.2011.03.004>

- Roberts, J. L. (1975). Active Branchial and Ram Gill Ventilation in Fishes. *Biological Bulletin*, 148(1), 85–105. Recuperado de:<http://doi.org/10.2307/1540652>
- Rodríguez-Ibarra, L. E., Abdo-De La Parra, M. I., Aguilar-Zrate, G., Velasco-Blanco, G., and Ibarra-Castro, L. (2015). Desarrollo osteológico de la columna vertebral y del complejo caudal de larvas de *Lutjanus guttatus* (Perciformes: Lutjanidae) en condiciones de cultivo. *Revista de Biología Tropical*, 63(1), 155–164.
- Román-Rodríguez, M.J., (1990). Alimentación de *Totoaba macdonaldi* (Gilbert) (Pisces: Scianidae) en la parte norte del Alto Golfo de California. *Ecológica* 1 (2), 1–9.
- Rueda-López, S., Lazo, J. P., Reyes, G. C., and Viana, M. T. (2011). Effect of dietary protein and energy levels on growth, survival and body composition of juvenile *Totoaba macdonaldi*. *Aquaculture*, 319(3-4), 385–390. Recuperado de:<http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.07.007>
- Sanatamaría, J. A., Andrades, J. A., Herráez, P., Fernández-Llebreg, P., and Becerra, J. (1994). Perinotochordal connective sheet of gilthead sea bream larvae (*Sparus aurata*, L.) affected by axial malformations: An histochemical and immunocytochemical study. *The Anatomical Record*, 240(2), 248–254. Recuperado de:<http://doi.org/10.1002/ar.1092400212>
- Sandoval, G.(2002). Desarrollo morfológico de *Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1890) durante su estadio larval. Tesis de licenciatura. Universidad autónoma de Baja California.
- Saravanan, M., Prabhu Kumar, K., and Ramesh, M. (2011). Haematological and biochemical responses of freshwater teleost fish *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes) during acute and chronic sublethal exposure to lindane. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100(3), 206–211. Recuperado de:<http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.04.002>
- Schreck, C. B., Moyle, P. B., and Section, A. F. S. E. (1990). *Methods for fish biology*. American Fisheries Society. Retrieved from <https://books.google.com.mx/books?id=WLPwAAAAMAAJ>
- Sfakianakis, D. G., Renieri, E., Kentouri, M., and Tsatsakis, A. M. (2015). Effect of heavy metals on fish larvae deformities: A review. *Environmental Research*, 137, 246–255. Recuperado de:<http://doi.org/10.1016/j.envres.2014.12.014>
- Soares, M. G. M., Menezes, N. A., and Junk, W. J. (2006). Adaptations of fish species to oxygen depletion in a central Amazonian floodplain lake. *Hydrobiologia*, 568(1), 353–367. Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/s10750-006-0207-z>
- Stickney, R. R. (2000). *Encyclopedia of aquaculture*. (G. Collins, Ed.) *PhD Proposal* (Vol. 1). New York: Wiley-interscience. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- Summerfelt, R. C. (1996). Intensive Culture of Walleye Fry. *Walleye Culture Manual*, 161–185.
- Tierney, K. B., and Farrell, A. P. (2004). The relationships between fish health, metabolic rate, swimming performance and recovery in return-run sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 27(11), 663–671. Recuperado de: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00590.x>
- Trotter, A. J., Pankhurst, P. M., and Hart, P. R. (2001). Swim bladder malformation in hatchery-reared striped trumpeter *Latris lineata* (Latridae). *Aquaculture*, 198(1-2), 41–54. Recuperado de: [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00594-9](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00594-9)
- True, C. (2012). Desarrollo de la biotecnia de cultivo de Totoaba macdonaldi. Fcm.Ens.Uabc.Mx. Recuperado de: [http://fcm.ens.uabc.mx/jatay/tesis/posgrado/oceanografia_costera/doctorado/Desarrollo de la biotecnia de cultivo de Totoaba.pdf](http://fcm.ens.uabc.mx/jatay/tesis/posgrado/oceanografia_costera/doctorado/Desarrollo%20de%20la%20biotecnia%20de%20cultivo%20de%20Totoaba.pdf)
- Tucker, J. E. (1998). *Marine Fish Culture. Marine Fish Culture*.
- Verhaegen, Y., Adriaens, D., Wolf, T. De, Dhert, P., and Sorgeloos, P. (2007). Deformities in larval gilthead sea bream (*Sparus aurata*): A qualitative and quantitative analysis using geometric morphometrics. *Aquaculture*, 268, 156–168. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.037>