

Tesis defendida por

Yasel María Guarneros Orea

Y aprobada por el siguiente comité

Dr. Benjamín Barón Sevilla

Director del Comité

Dra. Diana Tentori Santa Cruz

Miembro del Comité

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera

Miembro del Comité

Dra. Beatriz Cordero Esquivel

Coordinador del programa de
posgrado en Acuicultura

Dr. David Hilario Covarrubias
Rosales

Director de Estudios de Posgrado

16 de Noviembre de 2012

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA



PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN ACUICULTURA

Descripción de la génesis gonadal e identificación del periodo lábil para la
diferenciación sexual del Lengado de California, *Paralichthys californicus*
(AYRES, 1859).

Tesis

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta

Yasel María Guarneros Orea

Ensenada, Baja California, México

2012

Resumen de la tesis de Yasel María Guarneros Orea, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Descripción de la génesis gonadal e identificación del período lábil para la diferenciación sexual del lenguado de California, *Paralichthys californicus* (AYRES, 1859).

Resumen aprobado por:

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Director de Tesis

El lenguado de California es la especie de pez plano de mayor importancia comercial en la costa Noroeste de México, tanto por el estado de sus poblaciones en el medio natural como por la demanda comercial, esto lo convierte en un buen candidato para la acuicultura. En algunas especies de peces planos del género *Paralichthys*, incluido el lenguado de California, las hembras son de mayor tamaño y crecen más rápido que los machos, por lo que el cultivo monosexual de hembras puede constituir una ventaja para su cultivo. En condiciones de cultivo se han presentado proporciones sexuales de 100% machos, evento que es anormal en la naturaleza, donde la proporción varía de 1:0.68 (H:M) en el estero de Punta Banda reportado por Navarro-Mendoza (1985), mientras que Ramírez-Gonzalez (1990) en la Bahía de Todos Santos reportó una proporción de 1:2.2. El objetivo de este trabajo fue describir la génesis gonadal, desde la aparición del primordio gonadal hasta su diferenciación en ovario o testículo, e identificar el periodo lábil para la diferenciación sexual del Lenguado de California. Para identificar el periodo labil e inducir el desarrollo de progenies hembras, se aplicaron baños de 17β estradiol por periodos de 20 días (iniciando un nuevo tratamiento cada 15 días) durante los primeros 100 días después de la eclosión. Los resultados obtenidos de los análisis histológicos mostraron para la temperatura de cultivo de 16°C una proporción sexual de 16% de hembras y 84% de machos, mientras que para la temperatura de cultivo de 20°C no pudo determinarse la proporción debido a que el bioensayo se detuvo cuando los organismos presentaron gónadas indiferenciadas. En los ovarios presuntivos de *P. californicus*, la cavidad ovárica aparece en peces con una longitud de 94 mm; mientras que el tejido testicular se identifica en organismos de longitud de 72 mm. El periodo sensible para la diferenciación sexual en el lenguado de California se encuentra entre el día 29 y 158 DDE.

Palabras Clave: *Paralichthys californicus*, monosexo, 17β estradiol.

Abstract of the thesis presented by Yasel María Guarneros Orea as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

Description of gonadal genesis and identification of labile period for sex differentiation of the Halibut of California, *Paralichthys californicus* (AYRES, 1859).

Abstract approved by:

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Thesis Director

The California halibut (*Paralichthys californicus*) is high value commercial species from the Northwestern Mexico considered to have great potential for aquaculture. Females of some species of flatfish of the genus *Paralichthys*, including the California Halibut, are larger and grow faster than males. Therefore farming California halibut females only (i.e. in monosex-cultures) can be advantageous for the culture of this species. Under culture conditions proportions of 100% males have been observed, which are not found in nature. Sex ratio in nature, typically varies from 1:0.68 (F:M) in Punta Banda Estuary reported by Navarro-Mendoza (1985), to 1:2.2 reported by Ramírez-Gonzalez (1990) for Todos Santos Bay. Thus, the purpose of this study was to describe gonadal development from the appearance of the gonadal primordia to the differentiation of either ovary or testes, and identifying the labile period for sexual differentiation in California's Halibut using steroids. To induce the development of female progeny, larvae were immersed daily in baths of estradiol-17 β for periods of 20 days (starting a new treatment every 15 days) during the first 100 days after hatching. Results from histological analysis showed that for a water temperature of 16°C, the sex ratio obtained was 16% females and 84% males, whereas for 20°C, no determination could be achieved since the bioassay was terminated when organisms had still undifferentiated gonads. In the presumptive ovaries of *P. californicus*, ovarian cavity first occurred in fish with a total length (TL) of 94 mm; while testicular tissue was identified in organisms with a TL of 72 mm. The labile period for sex differentiation in California Halibut was found to be between day 29 and day 158 after hatching. The implications of these results for the development of this species culture are discussed.

Keywords: *Paralichthys californicus*, monosex, estradiol - 17 β .

Dedicatoria

A mi hija Ana Sofía por su apoyo y amor incondicional, por ser la inspiración de mi vida, y darme excelentes enseñanzas de vida

A mis padres: Javier Guarneros Avalos y Araceli Orea Duarte, por estar conmigo en todo momento y en cada decisión que tomo, dándome su inmenso cariño y apoyo para lograr mis metas

A mis hermanos: Javier y Juan Pablo Guarneros Orea, por ser mis más confidentes y acompañantes de vida

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) particularmente al Departamento de Acuicultura, por haberme aceptado en el programa de posgrado. Asimismo por brindarme el apoyo necesario durante mis estudios.

Al Consejo Nacional Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado a través de una beca durante la realización de mis estudios.

A la Dirección de Estudios de Posgrado del CICESE y al Departamento de Acuicultura, por otorgarme un mes de beca para la terminación de la tesis.

Al Dr. Benjamín Barón Sevilla, por aceptarme como parte de su equipo de trabajo, por brindarme su confianza y apoyo incondicional en todo momento, por haber compartido conmigo sus conocimientos.

A la Dra. Diana Tentori Santa Cruz y al Dr. Juan Pablo Lazo Corvera por aceptar estar en mi comité, por su gran apoyo, aportes y comentarios durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Sharon Zinah Herzka por su apoyo en la aportación de muestras de *P. californicus* del estudio "Función de un sistema estuarino para subadultos y adultos del lenguado de California *Paralichthys californicus*".

A la M. en C. Marisol Simón Díaz, y a los técnicos Uvinai Salgado Ramos y Jesús Mariscal Medina por su apoyo incondicional en todo momento y por su gran amistad.

A la M. en C. Yanet Guerrero por ayudarme con la preparación y montaje de los cortes histológicos.

A los Ing. Francisco Javier Ponce Isguerra y José María Domínguez Olachea por su apoyo en la edición y realización de las imágenes de mi tesis, así como por su paciencia en las múltiples correcciones.

A mis amigos de generación: Tyrone, Isaías, Chema, Edson, Víctor, Diana, por compartirme sus conocimientos y amistad, y en especial a José Ángel por siempre estar junto a mí, por darme palabras de aliento, llamadas de atención y apoyarme durante toda mi estancia en Ensenada y aún en Puebla, Muchas Gracias! A Noé Canseco por ser un amigo incondicional, por darme la fuerza para creer que podría con esta meta, por apoyarme en muchas ocasiones y tener siempre las palabras correctas.

A mis amigas Diana (hermanita), Arlette, Ale (coma), Diana Judith, Soco por compartir conmigo la pasión por la Biología, por creer en mi en todo momento, alentarme a seguir adelante y nunca dejarme sola pese a la distancia que nos separa. A Jorge Flores por renunciar a tu vida en Puebla para apoyarme con Sofí.

Y a todas las personas que de una u otra manera estuvieron conmigo y que por el momento no recuerdo para plasmar sus nombres, Muchas Gracias!

Contenido

Resumen en español.....	3
resumen en inglés.	4
Lista de figuras	10
Lista de tablas	12
1. Introducción	13
1.1. Reproducción.....	13
1.2. Desarrollo gonadal	14
1.2.1. Células germinales primordiales (CGP)	15
1.2.2. Desarrollo gonadal y del sistema genital masculino	18
1.2.2.1. Espermatogénesis	19
1.2.3. Desarrollo gonadal y del sistema genital femenino	20
1.2.3.1. Ovogénesis	20
1.3. Determinación y diferenciación del sexo	21
1.4. Esteroides sexuales	25
1.4.1. Enzima P450 aromatasas	26
1.5. Lengado de California	28
1.6. Justificación	31
1.7. Hipótesis.....	32
1.8. Objetivos.....	32
1.8.1. Objetivo General	32
1.8.2. Objetivos Específicos.....	32
2. Materiales y Métodos.....	33
2.1. Origen de las larvas de lengado.....	33
2.2. Protocolo de cultivo para el experimento con esteroides	33
2.2.1. Identificación del periodo lábil para la diferenciación sexual	34
2.3. Protocolo de cultivo para el experimento sin esteroides	37
2.4. Condiciones generales para ambos cultivos	37
2.5. Descripción de la génesis gonadal e identificación del sexo.....	39
3. Resultados.....	42
3.1. Experimento con esteroides.....	42

Contenido (continuación)

3.1.1. Supervivencia en el experimento con esteroides	43
3.2. Experimento sin esteroides	45
3.2.1. Supervivencia en el experimento sin esteroides.....	46
3.3. Descripción de la génesis gonadal e identificación del sexo.....	47
3.3.1. Longitud de 9 a 10 mm (29DDE)	50
3.3.2. Longitud de 15 a 19 mm (39DDE)	51
3.3.3. Longitud de 22 a 35 mm (60DDE)	53
3.3.4. Longitud de 47 a 61 mm (97DDE)	54
3.3.5. Longitud de 64 a 99 mm (128DDE)	55
3.3.6. Longitud de 72 a 104 mm (158DDE)	55
3.3.7. Longitud de 70 a 130 mm (189DDE)	57
3.3.8. Longitud de 74 a 161 mm (220DDE)	58
3.3.9. Longitud de 104 a 193 mm (255DDE)	59
3.4. Posición de la gónada en el lenguado de California	62
3.5. Inducción del sexo de <i>Paralichthys californicus</i> con 17 β estradiol.....	63
3.5.1. Efecto del 17 β estradiol en la estructura histológica de las gónadas de <i>P. Californicus</i>	65
4. Discusión	70
4.1. Experimento con esteroides.....	70
4.2. Identificación del periodo lábil para la diferenciación sexual	76
4.3. Experimento sin esteroides	78
4.4. Comparación entre los cultivos experimentales	79
4.5. Descripción de la génesis gonadal e identificación del sexo.....	82
Conclusiones y Recomendaciones.....	84
Referencia Bibliográfica.....	85

Lista de figuras

Figura 1. Célula germinal primordial observada en el primordio gonadal del lenguado de California de 29 DDE.	17
Figura 2. Patrones de determinación sexual dependiente de la temperatura (TSD) en peces que han sido reconocidos hasta la fecha. Modificado de “Temperature-Dependent Sex Determination in Fish Revisited: Prevalence, a Single Sex Ratio Response Pattern, and Possible Effects of Climate Change”, De Ospina-Álvarez y Piferrer, 2008.	23
Figura 3. Localización del periodo lábil para el tratamiento eficaz de esteroides sexuales en relación con el desarrollo de varias especies de teleósteos. Adaptado de “Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish”, De Piferrer, 2001.	24
Figura 4. Esteroidogénesis. Se representan en cuadros morados las enzimas de la esteroidogénesis y los genes codificantes. En los cuadros azules se representa a los metabolitos esteroidogénicos. Las líneas punteadas indican la reacción en la que intervienen las enzimas.	26
Figura 5. Modelos de crecimiento para el lenguado de California.	29
Figura 6. Capturas comerciales anuales (libras) de lenguado de California de 1916 a 2001. Adaptado de “California Halibut, <i>Paralichthys californicus</i> ”, De Ish, Stroman, 2006.	30
Figura 7. Diagrama del protocolo para identificar el periodo lábil para la diferenciación sexual en <i>Paralichthys californicus</i> , aplicando 17 β estradiol.	36
Figura 8. Ubicación de la gónada con respecto a la cavidad abdominal en <i>P. californicus</i> de 159 mm. Las líneas punteadas indican la ubicación de la cavidad abdominal; la línea continua muestra la ubicación de las gónadas.	39
Figura 9. Diagrama de la orientación anatómica de <i>Paralichthys californicus</i> consideradas para la descripción de la génesis gonadal.	41
Figura 10. Proceso de gametogénesis en <i>P. californicus</i> . 1. Célula germinal primordial, 2. División celular (Mitosis o Meiosis), 3. Espermatozoides primarios, en las hembras no se observó el estadio correspondiente, 4. Ovocito.	48
Figura 11. Longitud total promedio (mm) y edad en días después de la eclosión del lenguado de California <i>P. californicus</i> cultivados en dos condiciones diferentes en el laboratorio (E. con E2: grupo control del experimento con esteroides; E. sin E2: experimento sin esteroides).	50
Figura 12. Gónada de <i>Paralichthys californicus</i> de 9 mm de longitud. A. Vista lateral de un corte histológico. B. Primordio gonadal con una célula germinal primordial. TR tejido renal; CGP célula germinal primordial; P peritoneo; TI tejido intestinal; PG primordio gonadal; M músculo.	52

Lista de figuras (continuación)

Figura 13. Gónada de <i>Paralichthys californicus</i> de 35 mm de longitud. SD sistema digestivo; CGP célula germinal primordial; G Gónada; M músculo.	53
Figura 14. Gónada indiferenciada del lenguado de California, <i>Paralichthys californicus</i> de 73 mm de longitud. L lóbulos; GO gonias; T trabéculas; Cs Células somáticas.....	54
Figura 15. Ovario de <i>Paralichthys californicus</i> de 94 mm de longitud. A. Porción del ovario con ovogonias y cavidad ovárica. B. Porción del ovario que aun tiene sitio indiferenciado. CO cavidad ovárica; M músculo; OV Ovogonias; Cs Células somáticas.....	56
Figura 16. Testículo de <i>Paralichthys californicus</i> de 98 mm de longitud. ES espermatogonias; ESP espermatocitos; ESPd Espermatocitos en división; T trabéculas.	57
Figura 17. Testículo de <i>Paralichthys californicus</i> de 109 mm. ES espermatogonias; ESP espermatocitos; T trabéculas.....	58
Figura 18. Ovario de <i>Paralichthys californicus</i> de 142 mm. A. Porción del ovario unido al mesovario. B. Ovocitos previtelogénicos y cavidad ovárica. OP ovocitos previtelogénicos; CO cavidad ovárica; TR tejido renal; MS mesovario; L lamelas.	60
Figura 19. Testículo de <i>Paralichthys californicus</i> de 158 mm de longitud. Lo lóbulos; LU luz del lóbulo; CD conducto deferente.	61
Figura 20. Disección de un ovario de <i>Paralichtys californicus</i>	62
Figura 21. Ubicación de la gónada con respecto al riñón y la cavidad abdominal en una larva de <i>P. californicus</i> de 34 DDE.	63
Figura 22. Longitud total (mm) de los lenguados de California del grupo control y los expuestos al estradiol (E2). Los rombos negros indican los organismos del grupo control, y los círculos grises indican los organismos del grupo expuesto al estradiol.	65
Figura 23. Gónada atrofiada de <i>P. californicus</i> de 25 mm de longitud, expuesta a 17β estradiol durante los días 50 a 70 DDE. G Gónada; M musculo; SD sistema digestivo; H hígado.	66
Figura 24. Gónada indiferenciada de <i>P. californicus</i> de 50 mm de longitud, expuesta a 17β estradiol durante los días 69 al 89 DE. LI Lúmen intestinal; G gónada; TR tejido renal; M músculo.	67
Figura 25. Gónada atrofiada de <i>P. californicus</i> de 41 mm de longitud, expuesta a 17β estradiol durante los días 69 al 89 DE. SD sistema digestivo; G gónada; TR tejido renal; M músculo.	68

Lista de tablas

Tabla 1. Criterios morfológicos que se usaron para clasificar y describir el desarrollo gonadal del lenguado de California durante el análisis histológico.	41
Tabla 2. Características fisicoquímicas del medio de cultivo de <i>Paralichthys californicus</i> . Valores: media \pm error estándar.....	42
Tabla 3. Características químicas para los diferentes tratamientos durante la etapa de experimentación con <i>Paralichthys californicus</i>	43
Tabla 4. Supervivencia en porcentaje de los tratamientos en el día 66 después de la eclosión.....	45
Tabla 5. Características fisicoquímicas para el cultivo en el tanque de 9,000 l. O.D.: Oxígeno disuelto; E.E: Error estándar; f: fuera de la jaula; d: dentro de la jaula; t: tanque; j1: jaula 1.	46
Tabla 6. Resumen de eventos morfológicos del desarrollo gonadal y diferenciación sexual de <i>P. californicus</i>	49
Tabla 7. Proporción sexual de los juveniles de <i>Paralichthys californicus</i> cultivados hasta el día 255 después de la eclosión	62
Tabla 8. Longitud total (mm) de los lenguados de California expuestos al estradiol (E ₂) y el grupo control a los 60 y 95 días después de la eclosión.	64

1. Introducción

1.1. Reproducción

Entre los vertebrados, los peces representan más del 50% de las especies conocidas, por lo que son el grupo más diverso y numeroso. La cantidad de especies conocidas aumenta de forma progresiva y para el 2006 se habían identificado ya 27,977 especies (Nelson, 2006). La diversidad de especies se manifiesta también por el tipo de hábitat que utilizan, comportamiento, morfología, así como también en la reproducción (Piferrer, 2009).

La reproducción sexual tiene dos funciones biológicas básicas: asegurar la continuidad de la especie, así como la de transmitir y recombinar el material genético. Los peces presentan tres tipos de reproducción: unisexualidad, hermafroditismo y gonocorismo (Hershberger, 2000; Piferrer, 2009).

La unisexualidad se caracteriza porque todos los individuos de la población son hembras y se reproducen por partenogénesis, ya que la reproducción depende de células sexuales femeninas no fecundadas, y puede presentarse como ginogénesis o hibridogénesis (Piferrer, 2009). La ginogénesis produce descendencia a partir de huevos activados por el esperma de un macho de una especie similar pero sin que contribuya genéticamente a la progenie, como es el caso de *Poecilia formosa*, especie híbrida formada a partir de *P. mexicana* y *P. latipina*. Por otro lado, la hibridogénesis implica que las hembras se reproduzcan con un macho de una especie relacionada, en donde el esperma si contribuye genéticamente a la descendencia; las hembras resultantes de ese cruce producen sus propios huevos que han perdido el material genético del macho, transmitiendo a la descendencia sólo los cromosomas maternos. El caso mejor estudiado es el híbrido *Poeciliopsis monacha-lucida*, que son únicamente hembras, y se originan de la reproducción de hembras de *P. monacha* con machos de *P. lucida*, estas

especies presentan fertilización interna y son ovíparas (Angus *et al.*, 1979; Piferrer, 2009).

El hermafroditismo es otro tipo de reproducción sexual en la cual un individuo puede expresar ambos sexos, ya sea en forma simultánea o secuencial. Las especies hermafroditas simultáneas producen gametos masculinos y femeninos al mismo tiempo; mientras que las especies hermafroditas secuenciales maduran primero como un sexo, y después como el sexo opuesto. Dependiendo del sexo que desarrollen primero, se dividen en protándricas si primero maduran como machos, o protogíneas si su primer desarrollo ocurre como hembras (Devlin y Nagahama, 2002; McMillan, 2007, Piferrer, 2009).

El gonocorismo es el tipo más frecuente de reproducción sexual entre los peces, y se caracteriza por involucrar dos fenotipos sexuales, es decir, la presencia de hembras que producen óvulos y machos que producen espermatozoides. Más del 90% de las especies de peces presentan este tipo de reproducción, incluido *Paralichthys californicus* (Piferrer, 2009).

1.2. Desarrollo gonadal

En los mamíferos, las gónadas se desarrollan a partir de un primordio gonadal común que está ubicado en la región dorsal del epitelio celómico, en la región donde se desarrolla el tejido del mesonefros, que es la formación que aparece en la organogénesis del aparato urogenital del embrión y que hace las funciones de órgano excretor transitorio mientras no se forma el riñón definitivo, éste aparece en la organogénesis del aparato urogenital del embrión, y realiza las funciones de órgano excretor transitorio mientras se forma el riñón definitivo (Gilbert, 2006). La corteza representa la cresta gonadal de naturaleza epitelial que dará lugar al ovario, mientras que la médula es tejido parenquimatoso de la zona ubicada entre la cresta y el mesonefros y que da origen a los testículos. Durante el

estado indiferenciado ambos tejidos coexisten, sin embargo, en un momento determinado, uno de ellos empieza a desarrollarse mientras que el otro se degenera (Gilbert, 2006; Piferrer, 2009).

En los peces teleósteos, las gónadas se desarrollan a partir del epitelio dorsolateral de la cavidad abdominal (epitelio peritoneal), y su desarrollo también está asociado al del sistema renal. Las gónadas derivan de un solo primordio gonadal, ya que se desarrollan a partir del tejido que en los mamíferos corresponde a la corteza. Esta característica se ha intentado relacionar con la condición lábil que caracteriza el desarrollo sexual de los peces (Nakamura, 1998; Gilbert, 2006; Luckenbach, 2009).

1.2.1. Células germinales primordiales (CGP)

Las células germinales primordiales (CGP) son las células que darán origen a los gametos, por lo que son células bipotenciales, capaces de transformarse en espermatozoides u ovocitos. Tienen una estructura particular, son ovaladas, de mayor tamaño que las células somáticas, y tienen un límite celular distinto al resto de las células (Figura 1). Su núcleo se localiza excéntricamente y es redondo. Generalmente presentan un solo nucléolo, y el citoplasma contiene pocos organelos, como algunas mitocondrias relativamente grandes que se localizan cerca del núcleo. Las mitocondrias se encuentran íntimamente ligadas con el material denso llamado ciment o cuerpos germinales densos (Babin *et al.*, 2007; McMillan, 2007). Así mismo, un material denso del mismo tipo, conocido como nuages o gránulos germinales, aparece disperso a través del citoplasma perinuclear, y ha sido identificado en las CGP de teleósteos, lo que implica que los productos genéticos posiblemente también se requieren para permitir la diferenciación de las CGP de otros tipos celulares en los peces. (Koen Braat *et al.*, 1999; Devlin y Nagahama, 2002; Extavour *et al.*, 2003; Babin *et al.*, 2007).

El nucléolo es la estructura donde tienen lugar la síntesis y el procesamiento de ARNr (Ácido desoxirribonucleico ribosomal) y donde se ensamblan las subunidades ribosómicas. La mayor parte del ARN ribosómico de las células se sintetiza en el nucléolo, un subcompartimento del núcleo que no está delimitado por una membrana fosfolipídica. Algunas proteínas ribosómicas también se agregan a los ARN ribosómicos dentro del nucléolo. Las subunidades ribosómicas terminadas o parcialmente terminadas, así como las partículas que contienen ARNt (Ácido desoxirribonucleico de transferencia) y ARNm (Ácido desoxirribonucleico mensajero), pasan a través del poro nuclear hacia el interior del citosol para ser utilizadas en la síntesis de proteínas. Una vez transportadas estas subunidades ribosómicas al citoplasma se asocian con un ARNm y llevan a cabo la síntesis proteica con la ayuda de los ARNt y diversos factores de traducción. Así mismo, en el nucléolo se encuentra la región de los cromosomas (ADN) que contienen los genes altamente repetidos de ARNr. En el nucléolo se transcriben estos genes y se acoplan a proteínas ribosomales para formar las unidades pre-ribosomales que posteriormente darán lugar a los ribosomas del citoplasma. El tamaño del nucléolo refleja su actividad y puede cambiar con el tiempo en una misma célula. Puede ocupar más del 25% del volumen nuclear en células que están produciendo grandes cantidades de proteínas.

La apariencia del nucléolo cambia drásticamente durante el ciclo celular. Cuando la célula se aproxima a la mitosis el nucléolo va reduciendo su tamaño, hasta que desaparece cuando los cromosomas se han condensado y ha cesado toda la síntesis de ARN. Cuando se reanuda la síntesis de ARNr al final de la mitosis, un discreto nucléolo reaparece en las zonas cromosomales donde se encuentran los genes que codifican para ARNr, también los nucléolos reaparecen en el núcleo de las células hijas alrededor de las regiones del genoma que contienen genes de RNAr (Lodish *et al.*, 2005; Karp, 2006).

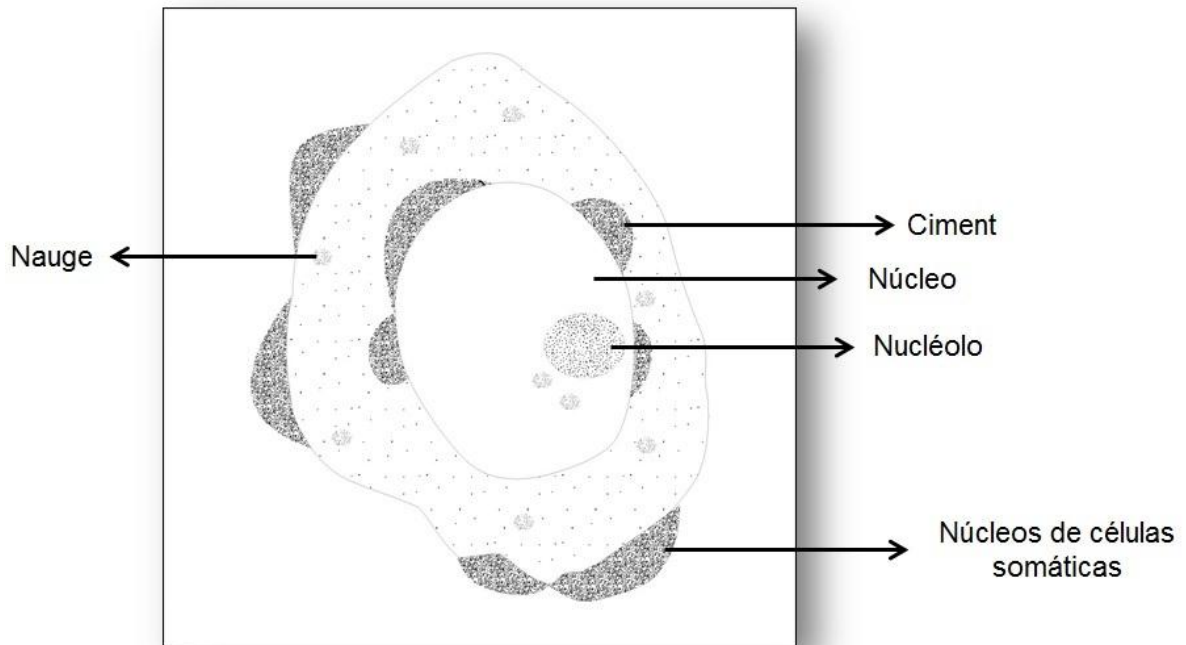


Figura 1. Célula germinal primordial observada en el primordio gonadal del lenguado de California de 29 DDE.

El mecanismo que genera a las células germinales primordiales parece ser altamente variable, incluyendo determinantes prelocalizados como es la preformación o procesos inductivos como la epigénesis (Extavour *et al.*, 2003).

En algunas especies, las células germinales pueden identificarse fácilmente en la embriogénesis cuando su diferenciación está asegurada por la localización de los determinantes maternos heredados (ARNm, proteínas, etc.), ya sea antes o inmediatamente después de la fertilización, a este mecanismo se le conoce como preformación. En otras especies, las células germinales se observan hasta el desarrollo, y surgen como resultado de señales de inducción de los tejidos circundantes, a este proceso se le conoce como epigénesis (Extavour *et al.*, 2003). En las especies de teleósteos estudiadas hasta ahora, la especificación de las CGP está controlada por el mecanismo de preformación, en donde los determinantes maternos son almacenados en el ovocito durante las primeras etapas de la ovogénesis en la estructura citoplasmática llamada plasma germinal (Herpin *et al.*, 2007; Presslauer *et al.*, 2012).

Posteriormente, las CGP migran hacia la región donde se forma el primordio gonadal y se establecen en el margen exterior del estroma, debajo el epitelio gonadal. Después, serán revestidas por células que provienen del epitelio gonadal (Gilbert, 2007; McMillan, 2007).

Para el mecanismo de preformación, las células germinales migran a través de la capa celular del intestino medio en la cavidad corporal al mesodermo, donde serán revestidas por precursores somáticos gonadales para formar un par de gónadas embrionarias (Nakamura, 2010). En la epigénesis, existen diferentes mecanismos en los peces para explicar la migración de las células germinales primordiales: 1) Por movimientos ameboides de las propias células, 2) Por liberación pasiva que se produce por movimientos morfogenéticos del tejido circundante, y 3) Al ser transportadas por la sangre (Gilbert, 2007; McMillan, 2007).

Finalmente, una vez que las CGP se encuentran en el primordio gonadal se dividirán para formar las gonias (ovogonias y espermatogonias).

1.2.2. Desarrollo gonadal y del sistema genital masculino

En la mayoría de los peces, los testículos son dos órganos alargados, unidos por el mesorquio a la pared dorsal de la cavidad corporal. Están rodeados por una cápsula de tejido conjuntivo fibroso llamada túnica albugínea, de la cual se proyectan trabéculas hacia el interior del testículo, proporcionándoles soporte. Entre las trabéculas se encuentran los túbulos seminíferos rodeados de tejido intersticial, que está constituido de tejido conjuntivo laxo con vasos sanguíneos y linfáticos, células de Leydig y fibras nerviosas. En el interior de los túbulos seminíferos, se forman los gametos masculinos por medio de la espermatogénesis, que comprende desde la diferenciación de las espermatogonias hasta la formación y liberación de los espermatozoides a la luz

tubular, proceso que se denomina espermiación (Uribe Aranzábal, 2002, Gil Cano *et al*, S.F.).

En los peces, el conducto deferente es independiente del mesonefros y los conductos urinario y reproductivo, solo se unen en el extremo posterior, en la región urogenital (Uribe Aranzábal, 2002, Gil Cano *et al*, S.F.).

Un criterio histológico para reconocer el desarrollo gonadal masculino, es la formación de los conductos deferentes. Antes de que se puedan observar espermatozoides primarios en la gónada que se diferenciará como testículo, es difícil distinguir el sexo a partir de la morfología gonadal, ya que las células germinales son similares o iguales en las futuras gónadas masculinas y femeninas, y suelen permanecer en un estado indiferenciado por un largo tiempo. Los rasgos histológicos que indican la formación de un testículo suelen observarse después del desarrollo gonadal femenino, incluso después de algunas semanas o meses (Nakamura, 1998).

1.2.2.1. Espermatogénesis

La espermatogénesis inicia con la formación de los quistes, estos se forman por la división mitótica de la espermatogonia tipo A, lo que dará lugar a espermatogonias tipo B, que posteriormente iniciarán el proceso meiótico dando lugar a los espermatozoides primarios. La primera división meiótica da lugar a dos células hijas, los espermatozoides secundarios. Posteriormente los espermatozoides secundarios se convertirán en espermátidas a través de una segunda división meiótica, entonces se transforman en espermatozoides por medio de un proceso llamado espermiogénesis, que involucra el desarrollo del flagelo. (Nagahama, 1983).

1.2.3. Desarrollo gonadal y del sistema genital femenino

Los ovarios de los teleósteos pueden ser un saco cerrado que se comunica con la cloaca por medio del conducto ovárico, o bien, pueden ser un conjunto de folículos que se abren a la cavidad corporal. Pueden ser órganos pares o impares, alargados y se unen al peritoneo por el mesovario. El ovario se conforma por tejido conectivo o túnica albugínea que se proyecta en forma radial hacia el centro del ovario en forma de láminas o lamelas que dejan un espacio central, llamado cavidad ovárica y cuyo tamaño depende del grado de desarrollo del ovario (Gil Cano *et al*, S.F.).

Los ovocitos maduros son descargados dentro de la cavidad ovárica y desplazados hacia el conducto ovárico (Nagahama, 1983).

El desarrollo ovárico se caracteriza por la diferenciación de las células somáticas y de las CGP que forman folículos. Un folículo se compone de un ovocito rodeado de una capa interna de células llamada granulosa y una capa externa llamada teca. En la mayoría de las especies, el desarrollo gonadal femenino se identifica histológicamente por la proliferación de las células somáticas y las ovogonias, así como con la diferenciación temprana de los ovocitos primarios, y con la formación de la cavidad ovárica (Nakamura, 1998; Devlin y Nagahama, 2002).

1.2.3.1. Ovogénesis

Durante el desarrollo del ovario, las ovogonias se dividen por mitosis para formar a una ovogonia premeiótica, la cual se diferenciará en ovocito primario a través de la primera división mitótica. Posteriormente entrará a la primera meiosis; en esta primera división el ovocito primario permanece detenido en el estado de diploteno de la profase por unos meses, hasta el comienzo de la pubertad en la mayoría de los teleósteos. La primera división meiótica da lugar a dos células que

difieren mucho en tamaño, un cuerpo polar muy pequeño, el cual se degenerara, y un ovocito secundario de gran tamaño. El ovocito secundario inicia la segunda meiosis y se detiene en la metafase hasta el momento la fecundación (Babin *et al.*, 2007; McMillan, 2007; Lubzens *et al.*, 2010).

1.3. Determinación y diferenciación del sexo

La determinación sexual es el proceso por el cual, desde el momento de la fertilización, se establece el sexo de un individuo. La determinación puede darse de manera genética o ambiental (Piferrer, 2009).

La determinación genética del sexo (GSD por sus siglas en inglés, genetic sex determination) implica que el sexo se establece genéticamente desde el momento de la fertilización. En las aves y mamíferos estos genes están concentrados en los cromosomas sexuales, que tienen características morfológicas y fisiológicas únicas, como es el caso del cromosoma “Y” o cromosoma masculino de los mamíferos y del cromosoma “W” o cromosoma femenino de las aves. Para el caso de los peces, hay algunas especies que tienen sistemas de determinación sexual similares a los de las aves o los mamíferos, sin embargo, pocas especies exhiben cromosomas sexuales heteromorfos, es decir, con diferente morfología, en la mayoría de las especies estudiadas los cromosomas son homomórficos. (Hershberger, 2000; Piferrer, 2009).

Paralichthys olivaceus, una especie emparentada con el lenguado de California, tiene un sistema de determinación sexual genético con cromosomas sexuales homomórficos, no obstante, los machos son heterogaméticos (XY) como en los mamíferos. A pesar de este sistema de determinación, la diferenciación sexual de las hembras (XX) parece ser inestable, ya que factores extrínsecos como la temperatura del agua y la exposición a hormonas sexuales, pueden

ocasionar la diferenciación de un fenotipo masculino (Nakamura *et al.*, 1998; Yamamoto, 1999; Luckenbach, 2009).

La determinación ambiental del sexo (ESD por sus siglas en inglés, environmental sex determination) implica que el sexo se establece un tiempo después de la fertilización, bajo la influencia de una variable ambiental como el fotoperiodo, salinidad, pH y la temperatura. En este tipo de determinación, no existen diferencias genéticas entre hembras y machos.

El momento en el que normalmente se produce la determinación sexual ambiental coincide con el momento en el que las gónadas son sensibles a los efectos de los estrógenos y de sus inhibidores.

La temperatura es el factor ambiental más estudiado como determinante ambiental del sexo, esta condición se denomina determinación sexual dependiente de la temperatura (TSD por sus siglas en inglés, temperature dependent sex determination). Durante el desarrollo temprano hay un periodo en el que las gónadas indiferenciadas son afectadas por la temperatura, determinando la diferenciación de un ovario o un testículo, y es llamado periodo lábil. Para los peces se han descrito tres patrones de determinación sexual dependiente de la temperatura, Figura 2: (A) indica que a mayor temperatura la proporción de machos se incrementa; (B) conforme aumenta la temperatura la proporción de machos disminuye; (C) a temperaturas bajas y altas, la proporción de machos aumenta, mientras que a temperaturas medias esta proporción

disminuye (Luckenbach, 2001 y 2009; Piferrer, 2008; Ospina-Álvarez, 2008).

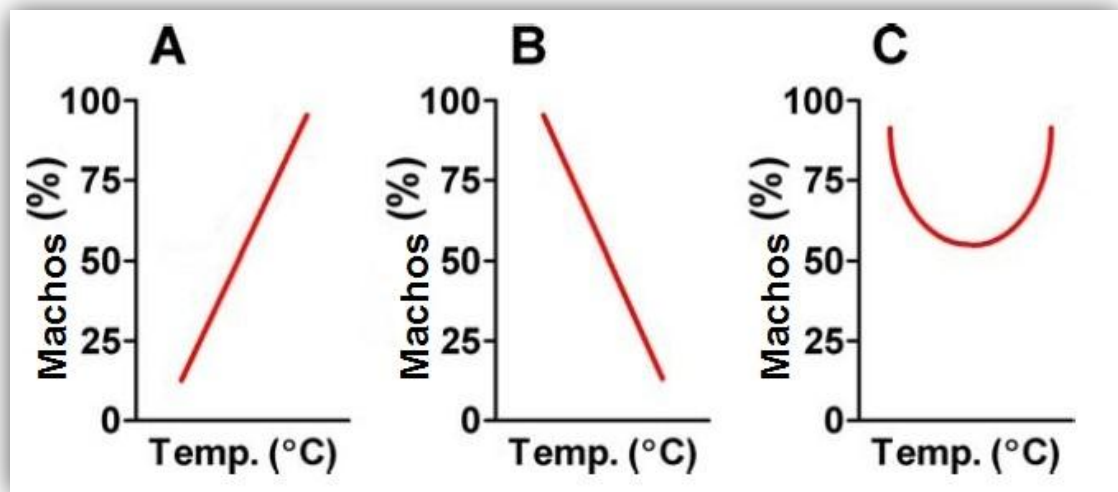


Figura 2. Patrones de determinación sexual dependiente de la temperatura (TSD) en peces que han sido reconocidos hasta la fecha. Modificado de “Temperature-Dependent Sex Determination in Fish Revisited: Prevalence, a Single Sex Ratio Response Pattern, and Possible Effects of Climate Change”, De Ospina-Álvarez y Piferrer, 2008.

La diferenciación sexual es el proceso por el cual un primordio gonadal ya formado pero sexualmente indiferenciado se transforma en ovario o testículo. Este proceso incluye mecanismos moleculares, como la expresión del gen de la aromatasa (involucrado en transformar a la testosterona en 17β - estradiol), y fisiológicos como la aparición de la primera diferencia en las gónadas rudimentarias, por ejemplo, la cavidad ovárica para el caso de las hembras, que se traducen en cambios morfológicos visibles. Estos mecanismos se llevan a cabo durante el desarrollo temprano, e involucran la migración de las células germinales (CGP) desde los tejidos extraembrionarios, hasta las crestas germinales que darán origen a las gónadas (Zanuy, 1987; Piferrer 2001; Luckenbach, 2009).

En la Figura 3 se muestra el periodo lábil, que puede definirse como un periodo corto de la vida de un organismo en el que se desarrollan las gónadas, es especie específico, y varía en relación con el desarrollo. De acuerdo con el momento y con la duración del periodo lábil, los peces teleósteos se pueden

clasificar en dos grupos: 1) especies cuya diferenciación ocurre alrededor de la eclosión o más comúnmente después de la eclosión, y es de corta duración (10 a 40 días); y 2) especies en donde la diferenciación ocurre durante la etapa juvenil y comprende periodos largos (150 a 500 días). El periodo lábil generalmente se ubica en un momento previo a la diferenciación morfológica de la gónada (Pandian, 1995; Piferrer, 2001).

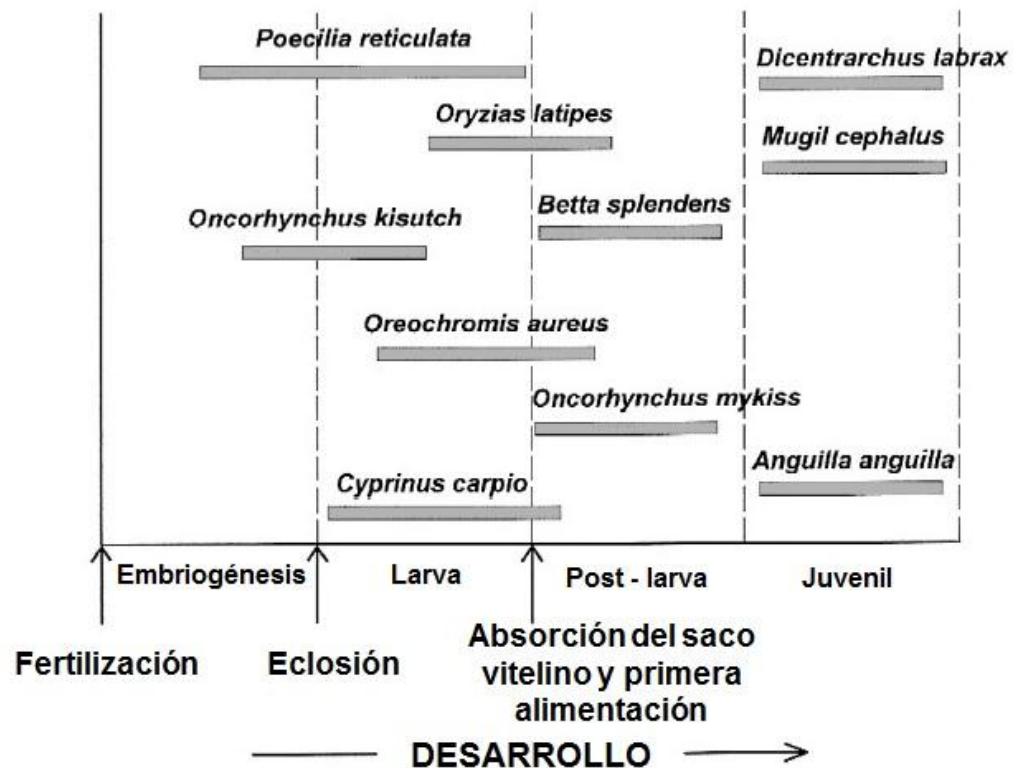


Figura 3. Localización del periodo lábil para el tratamiento eficaz de esteroides sexuales en relación con el desarrollo de varias especies de teleósteos. Adaptado de “Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish”, De Piferrer, 2001.

Aunque durante la diferenciación sexual los peces gonocóricos atraviesan por un periodo lábil, una vez que se han diferenciado los testículos u ovarios, el sexo es estable durante toda la vida del organismo (Devlin y Nagahama, 2002).

A pesar de la diversidad en el proceso de determinación y diferenciación sexual, existe un factor común que se conserva entre los peces teleósteos, en el control de la diferenciación ovárica, el cual involucra a los estrógenos y a la enzima necesaria para su síntesis (Guiguen *et al.*, 2010).

1.4. Esteroides sexuales

Los esteroides sexuales incluyen a los progestágenos, andrógenos y estrógenos, sin embargo en la diferenciación sexual influyen los últimos dos. Los estrógenos como el estradiol, generalmente se asocian con el desarrollo de las hembras, mientras que los andrógenos como la testosterona se asocian con el desarrollo de los machos (Luckenbach, 2009). Los esteroides se derivan del colesterol, el cual se obtiene mediante la ingestión de los alimentos o se sintetizan a partir de Acetil co-enzima A. El colesterol es trasladado al interior de la mitocondria con la ayuda de una proteína transportadora llamada StAR (por sus siglas en inglés Steroidogenesis Acute Regulator). Una vez que el colesterol se encuentra dentro de la mitocondria es convertido a pregnenolona; la cual migra de la mitocondria al citosol, que es la parte soluble del citoplasma de la célula, donde ocurren el resto de las reacciones para la síntesis de los esteroides. La esteroidogénesis se representa en la figura 4, mostrando las principales enzimas que intervienen en cada paso. Las principales enzimas son: 1. Para los mineralocorticoides: 21 – hidroxilasa y 18- hidroxilasa; 2. Para los glucocorticoides: 21 – hidroxilasa y 11- hidroxilasa; 3. Para los andrógenos: 12, 20 liasa. Las hormonas son sintetizadas en múltiples pasos en los que intervienen citocromos P-450 y deshidrogenasas β –HSD. Los citocromos específicos involucrados en el primer y último paso de la ruta biosintética del cortisol y la aldosterona son de localización mitocondrial. Mientras que los citocromos y deshidrogenasas que se requieren en los pasos intermedios, llevan a cabo su función en el citosol (Brandan *et al.*, 2008). Las principales enzimas esteroidogénicas que intervienen en la síntesis de esteroides sexuales son P450scc y P450c17; sin embargo, la

presencia de P45011 β , y CYP19 (aromatasa) son indicativas de la producción de andrógenos y estrógenos, hormonas importantes para la diferenciación sexual en los peces (Kitano, 1999; Luckenbach, 2009; Piferrer, 2009).

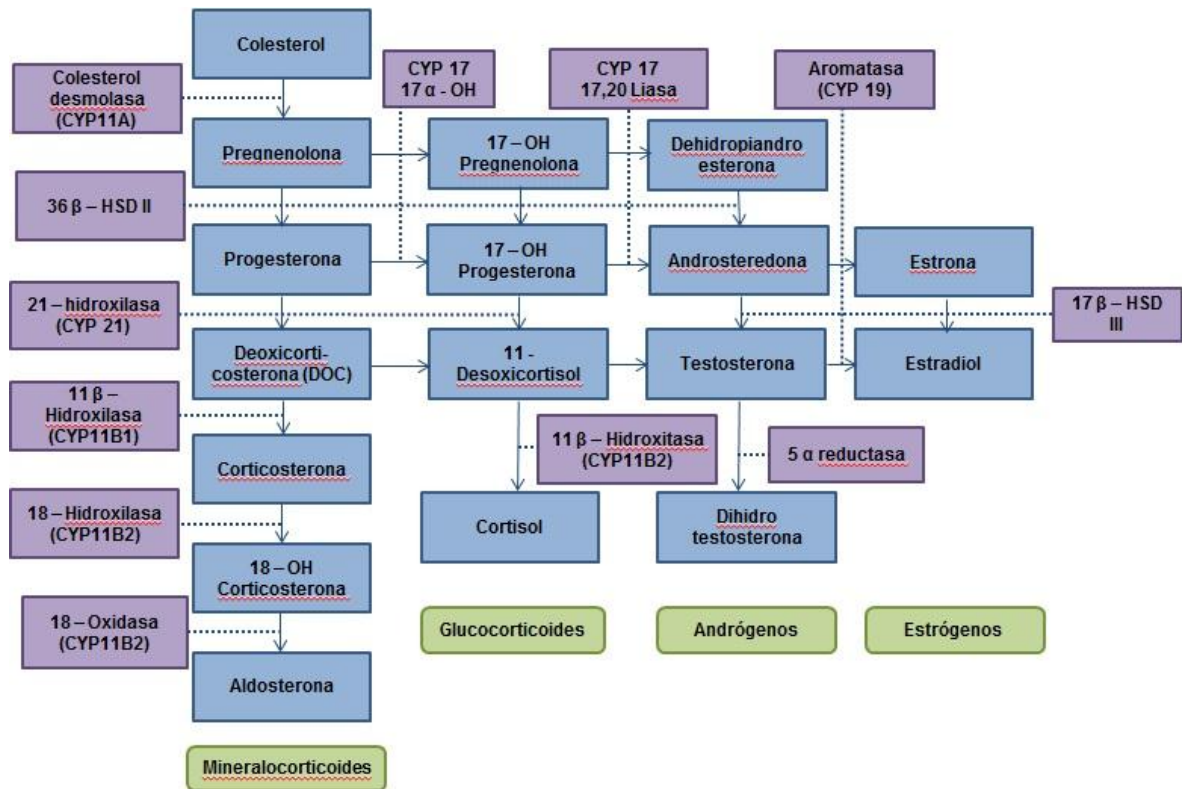


Figura 4. Esteroidogénesis. Se representan en cuadros morados las enzimas de la esteroidogénesis y los genes codificantes. En los cuadros azules se representa a los metabolitos esteroidogénicos. Las líneas punteadas indican la reacción en la que intervienen las enzimas.

1.4.1. Enzima P450 aromatasa

La biosíntesis de 17 β estradiol (E_2) es esencial para la diferenciación sexual de las hembras. La enzima aromatasa (P450a), es un miembro de la superfamilia del citocromo P450, y es importante en el complejo enzimático que contiene al citocromo P450 aromatasa, que en los vertebrados se encarga de transformar los andrógenos en estrógenos. La proteína que cataliza la aromatización de las

hormonas esteroideas, es codificada por el gen *cyp19*. (Kitano *et al.*; 1999; Feng He *et al.*, 2008)

En los peces teleósteos, el gen de la aromatasa está duplicado (Feng He *et al.*, 2008; Luckenbach, 2009; Blazquez *et al.*, 2010; Guiguen *et al.*, 2010). Por lo tanto, este gen ha resultado en dos isoformas de la P450a:

1. *cyp19a1a* o aromatasa gonadal, la cual se expresa predominantemente en el ovario.
2. *cyp19a1b* o aromatasa cerebral, que se expresa en el cerebro.

La aromatasa gonadal es la isoforma importante para la diferenciación sexual, por lo que un incremento de los niveles de su ARNm coincide con la diferenciación sexual femenina en diferentes especies (Guiguen *et al.*, 2010).

A pesar de los efectos feminizantes de los estrógenos, se ha encontrado, que los tratamientos con inhibidores de la aromatasa que bloquean la síntesis de estrógeno, inducen la masculinización cuando se han aplicado durante el periodo de diferenciación sexual en diferentes especies, incluido el lenguado japonés, *Paralichthys olivaceus* (Guiguen *et al.*, 2010).

Para relacionar el rol que tiene la enzima P450 aromatasa a la determinación sexual dependiente de la temperatura en *Paralichthys olivaceus*, Kitano (1999), demostró que cultivando las larvas a temperaturas elevadas (27°C), se suprime la síntesis del ARNm *cyp19a1a*, y por lo tanto los niveles de estradiol en todo el cuerpo, resultando en la inducción de la diferenciación sexual de machos. Aunado a esto, agregó al alimento de las larvas, el fradozol, que es un inhibidor de la aromatasa y, obtuvo resultados similares a los de la temperatura elevada, esto es, 100% machos. (Kitano, 1999; Luckenbach, 2009).

El aumento de la temperatura puede influir en la producción de esteroides, a través de la modificación de la estructura y función de las proteínas, y por lo tanto en las enzimas que están involucradas en dicha producción.

1.5. Lenguado de California

El lenguado de California, *Paralichthys californicus*, pertenece a la familia Paralichthyidae, y al género *Paralichthys* que incluye varias especies de peces planos en aguas mexicanas del Pacífico (Miller *et al.*, 1972). Su distribución abarca desde el Río Quillayute, Washington EUA, hasta Bahía Magdalena, Baja California México. (Berdegue, 1956; Allen *et al.*, 1988, 1990; Kuccas *et al.*, 1986, Boschung, 1983, Hobbs, 1990).

El Lenguado de California se caracteriza por tener un cuerpo aplanado, con forma elíptica, presenta ambos ojos de un solo lado del cuerpo y la línea lateral forma un arco muy pronunciado a la altura de las aletas pectorales. No muestran particularidad por el lado derecho o izquierdo en la migración del ojo durante la metamorfosis. Cuentan con mandíbulas y dientes bien desarrollados en ambos lados de la cabeza. Su coloración puede ser café grisácea a café oscuro, y pueden tener manchas negras en el cuerpo. Otra particularidad que lo caracteriza es que las hembras alcanzan mayores tamaños que los machos (Allen, 1990; Conkin, D.E y Piedrahita, R., 2003).

En la Figura 5 se presentan los modelos de crecimiento para *Paralichthys californicus*, propuestos por Hobbs *et al.* 1990, donde se observa que las hembras son de mayor tamaño que los machos de la misma edad.

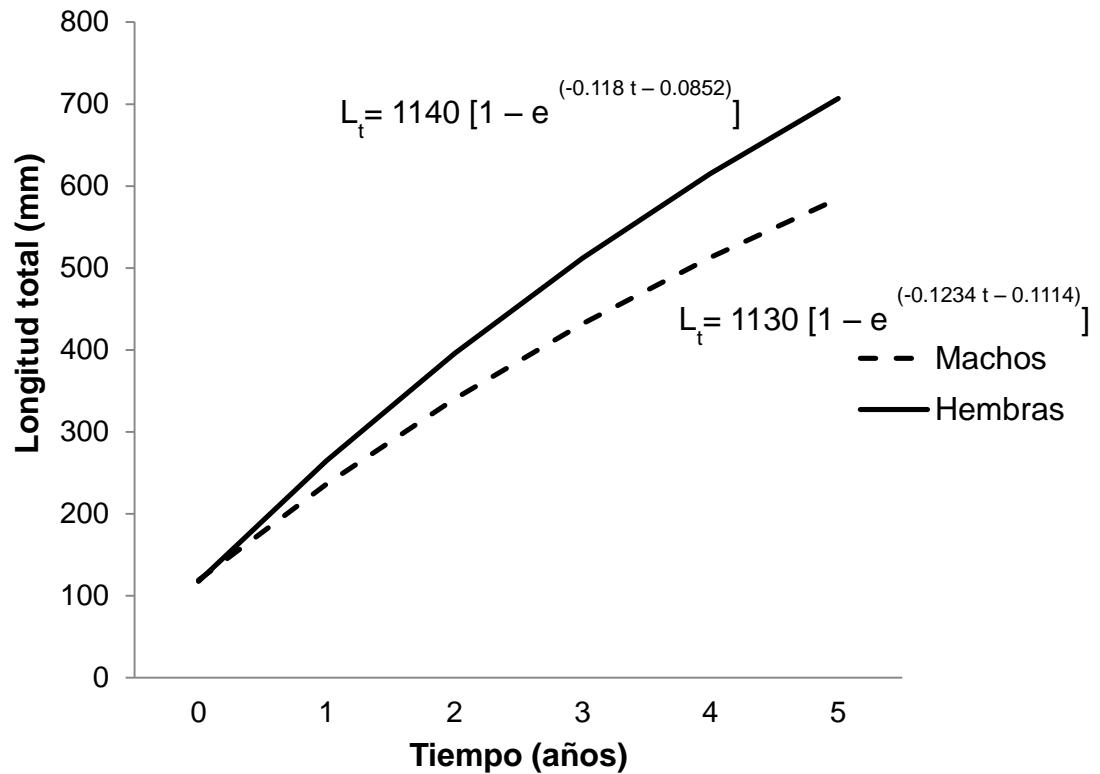


Figura 5. Modelos de crecimiento para el lenguado de California.

El lenguado de California tiene una reproducción ovípara y sus huevos son pelágicos. El desove ocurre a profundidades que van desde la zona costera en áreas protegidas como bahías y en áreas abiertas, en profundidades entre 6 y 20 m. La temporada de desove generalmente se extiende desde Febrero hasta Agosto, con mayor ocurrencia en Mayo. Los adultos son abundantes a profundidades menores de 20m, por esta razón se ha clasificado como una especie costera – estuarina (Allen, 1990).

Se encuentra entre las especies de peces planos de mayor importancia económica por el volumen de las capturas que se registran en las costas de California, EUA y Baja California, México. Llega a medir 1.5 m y pesar 32.7 Kg (Boschung, 1983), lo que la hace una especie atractiva para la pesca deportiva (Allen, 1988).

Los registros de la producción pesquera en México son fragmentarios, pero un análisis del estado de la pesca del lenguado de California en el estado de California EUA, puede dar una idea del estado de las poblaciones y por lo tanto de la tendencia general de la producción. Los registros de los desembarques de lenguado en el Estado de California, EUA inician en 1916 con una captura total de hasta 2.13 millones de kg en 1919. En los años posteriores, las capturas fueron variables, con tendencia a la disminución (Fig. 6) (Wertz *et al.* 2004). Desde la década de 1980 las capturas han sido constantes con alrededor de 453 mil kg por año, sin embargo en 1994 esta cantidad disminuyó como resultado de las regulaciones pesqueras (Ish y Stroman, 2006). Durante el periodo de 1916 a 1966 la flota norteamericana operó en aguas mexicanas y los desembarques muestran una disminución fluctuante más abrupta. Esta tendencia en las capturas puede reflejar que las poblaciones pesqueras de esta especie han disminuido considerablemente. A la fecha, la captura de lenguados en Baja California se hace durante la temporada reproductiva de la especie, lo que puede estar afectando negativamente las poblaciones silvestres.

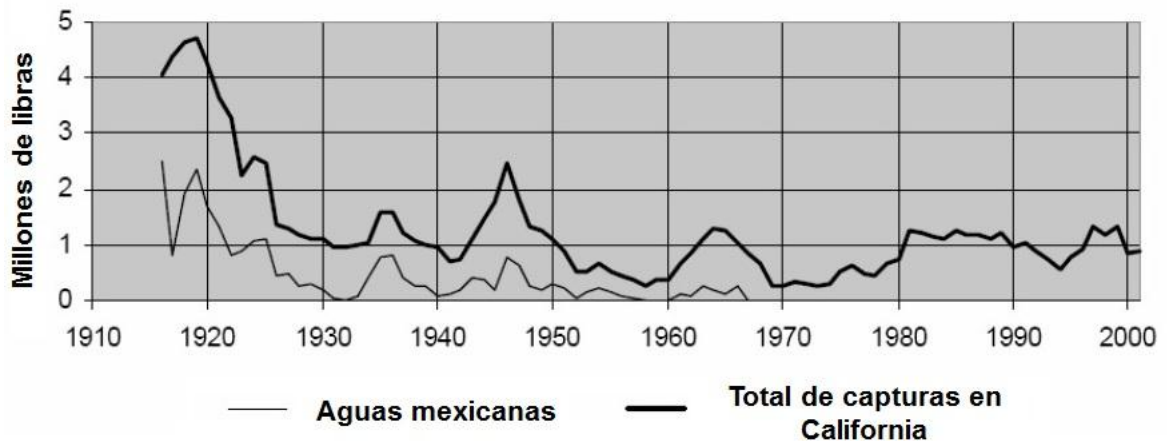


Figura 6. Capturas comerciales anuales (libras) de lenguado de California de 1916 a 2001. Adaptado de “California Halibut, *Paralichthys californicus*”, De Ish, Stroman, 2006.

La información disponible en relación con el proceso de determinación y diferenciación sexual del lenguado de California es escasa, recientemente,

Márquez- Reyes (2009) estudió el efecto de la temperatura en la diferenciación del sexo y sus resultados no mostraron un efecto claro, ya que se desarrollaron solo machos en todas las temperaturas evaluadas (15, 18, 21, 24 y 27° C). Posteriormente Conklin y Piedrahita (2010), en una revisión de los avances en el cultivo del lenguado de California informan también que las progenies producidas en laboratorio son totalmente masculinas.

1.6. Justificación

El lenguado de California es una especie con alto valor comercial y se ha documentado una disminución en el tamaño de sus poblaciones en su hábitat natural, por lo que el desarrollo de su cultivo es de interés para la acuicultura. Se sabe que las hembras crecen más rápido y alcanzan mayores tallas que los machos (Allen, 1988; Hobbs, 1990) lo que hace su cultivo más favorable, sin embargo, los resultados experimentales (Marquez- Reyez, 2009) y la experiencia empírica (Conklin y Piedrahita, 2010) indican que para los lenguados cultivados en laboratorio las progenies son 100% machos. Es importante destacar que estas proporciones no coinciden con aquellas observadas en las poblaciones silvestres del Lenguado de California, que son 1.0: 2.2. H:M (Hammann *et al.*, 1990), y 4.3:1 H:M; observadas en los desembarques pesqueros entre 1983 y 1988 (Sunada *et al.*, 1990).

Actualmente no existen trabajos relacionados con el desarrollo gonadal del lenguado de California, por lo que en este estudio describió la gonadogénesis por medio de cortes histológicos, a partir de la identificación de las células germinales dentro del primordio gonadal y hasta la formación de un ovario o testículo. También se identificó el periodo lábil para la diferenciación sexual de esta especie, lo que permitiría controlar las proporciones sexuales observadas para el lenguado de California en cautiverio y su posible aplicación en la acuicultura.

1.7. Hipótesis

La administración de 100 µg/l de 17 β estradiol favorecerá una proporción sexual de hembras de 10% durante el periodo sensible de la diferenciación sexual en el lenguado de California.

1.8. Objetivos

1. 8. 1. Objetivo General

- Describir la génesis gonadal, y evaluar el efecto de 17β estradiol en la diferenciación sexual en el Lenguado de California, *Paralichthys californicus*.

1. 8. 2. Objetivos Específicos

- Describir la génesis gonadal, identificando los diferentes estadios de desarrollo.
- Identificar el periodo lábil para la diferenciación sexual mediante la aplicación de 17β estradiol.
- Producir cultivos monosexuales de hembras.

2. Materiales y Métodos

El bioensayo se realizó en el laboratorio de peces marinos del Departamento de Acuicultura del CICESE en Ensenada, Baja California.

2.1. Origen de las larvas de lenguado

Los huevos de lenguado se obtuvieron de un desove espontáneo de reproductores de lenguado de la empresa “The Culture Abalone” en Goleta, California, EUA. Fueron transportados en bolsas de polietileno infladas con oxígeno puro a presión.

Los huevos fecundados se cuantificaron tomando una alícuota de 1 ml, para asegurar una distribución homogénea de los huevos, se agitó suavemente el agua que los contenía.

2.2. Protocolo de cultivo para el experimento con esteroides

Los huevos se sembraron a una densidad aproximada de 22 huevos/l por unidad experimental, en un sistema de 12 tanques ovalados de plástico con fondo plano de color guinda de 100 l. La temperatura del agua en los tanques se mantuvo entre 19.8°C y 21.1°C. El sistema fue iluminado con lámparas fluorescentes y se mantuvo un fotoperiodo de 24h luz durante 14 días.

Con la finalidad de mantener la misma temperatura del agua en todos los tanques, el día 14 DE (Después de la eclosión), se decidió redistribuir a las larvas a una densidad de 400 larvas por unidad experimental y cambiarlas a un sistema de 18 tanques circulares con fondo plano de fibra de vidrio de color azul claro de 275 l, esto debido a que todos los tanques estaban conectados a un sistema de recirculación con control de temperatura.

Durante la primera semana de experimentación, se restringió la circulación del agua para evitar que la turbulencia pudiera dañar y/o provocar la muerte de las larvas. Conforme aumentó su talla, la tasa de recambio de agua se incrementó en 1 l/min durante 3 días y posteriormente a 3 l/min.

Para mantener la calidad del agua, los tanques se conectaron a la red de agua oceánica filtrada del departamento de Acuicultura. Antes de ingresar a los tanques experimentales, el agua pasó por un filtro biológico y una lámpara de luz UV, con el fin de evitar contaminación y crecimiento de organismos ajenos al bioensayo. Para la eliminación de los restos de alimento y heces, los tanques se limpiaron diariamente con un sifón evitando la succión de las larvas. Sin embargo, a pesar del cuidado tenido, algunos lenguados eran succionados y regresados a sus tanques originales.

2.2.1. Identificación del periodo lábil para la diferenciación sexual

Para la identificación del periodo sensible a la inducción sexual mediante el uso de hormonas esteroideas, se llevo a cabo un bioensayo que consistió en seis tratamientos. En el presente trabajo un tratamiento se refiere al periodo (en días) después de la eclosión de las larvas, durante el que se administró el estradiol.

Los tratamientos consistieron en la exposición de las larvas a baños de una solución de 17β estradiol (E8875, Sigma Aldrich) a una concentración de 100 $\mu\text{g/l}$, por un periodo de 20 días cada uno y con un traslape de 5 días entre ellos. Brevemente, al primer tratamiento (T1), se le inicio la aplicación del estradiol al día 0 DE y de ahí cada día, al segundo tratamiento (T2) se le aplico al día 15 DE y de ahí cada día. Así sucesivamente al día 30 DE para el T3, 45 DE para el T4, 60 DE para el T5 y 75 DE para el T6 (ver Figura 7). Adicionalmente se evaluó un grupo control, al cual no se le aplicó el esteroide.

De acuerdo a las distintas temperaturas (15, 18, 21, 24 y 27°C) que evaluó Márquez-Reyes (2009), a 15 y 27°C el desarrollo de las larvas fue casi nulo, y en las temperaturas de 21 y 24°C el crecimiento fue favorable en las larvas de *P.californicus*. Con base en estos resultados, se consideraron temperaturas intermedias hipotéticas para establecer la temperatura para el cultivo con esteroides (14, 16, 18 y 20°C), y se eligió una temperatura de 20°C, ya que fue la más cercana a las temperaturas donde se reporta un mejor crecimiento, y esta no fue evaluada por Marquez – Reyes (2009). La temperatura de 18°C se descartó pues Márquez-Reyes (2009) obtuvo 100% machos a esta temperatura. Todos los tratamientos se hicieron por triplicado. La aplicación del estradiol se hizo por inmersión continua, es decir, que durante 20 días seguidos, el agua para cada tratamiento estuvo con una concentración de 100 µg/l constantemente, esto para cerciorarse que los organismos recibieran la cantidad de estradiol deseado.

La dosis de 100 µg/l se aplicó de acuerdo con la metodología utilizada en estudios similares con *Paralichthys olivaceus* (Bang *et al.*, 1995; Yamamoto, 1999). Esta dosis corresponde a la más alta utilizada por estos autores y fue además donde encontraron los mejores porcentajes de transformación del sexo.

Se inició la aplicación del esteroide al tratamiento 1, del día 0 a 20 DDE, y secuencialmente se administraron los tratamientos subsecuentes a los diferentes grupos de larvas, siguiendo el calendario descrito en la Figura 7.

Para suministrar el esteroide, se preparó una solución madre de 0.02% de E₂ en Dimetil Sulfoxido (D5879, Sigma Aldrich), en un volumen equivalente a la cantidad de E₂ que se utilizaría durante un periodo de 10 días para las tres repeticiones de un tratamiento. La solución concentrada de E₂ se almacenó en un frasco obscuro alejado de la luz y en refrigeración (4°C).

Para evitar la pérdida del esteroide, durante el tiempo que las larvas permanecieron expuestas a su efecto, las unidades experimentales no tuvieron circulación de agua. Una vez terminado el tiempo de exposición y, con la finalidad de eliminar el esteroide remanente, diariamente se hizo un recambio de agua a un flujo de 9.5 l/min durante una hora, que aseguraba el recambio total del agua, y después se aplicó la cantidad necesaria de la solución de E₂ para restablecer la concentración de 100 µg/l para cada tanque. Este procedimiento se repitió durante los 20 días para cada tratamiento.

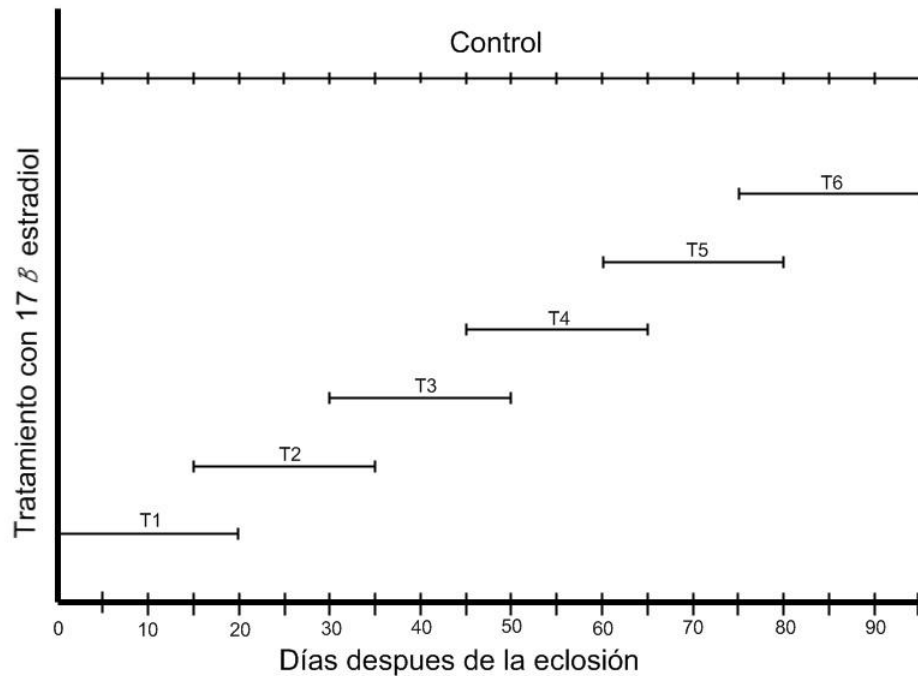


Figura 7. Diagrama del protocolo para identificar el periodo lábil para la diferenciación sexual en *Paralichthys californicus*, aplicando 17 β estradiol.

Antes de desechar al drenaje el agua extraída de cada tanque experimental, enriquecida con el esteroide, se recolectó en un reservorio de 500 l y desde ahí fue conducida con una bomba sumergible a través de un filtro con carbón activado para eliminar el esteroide.

El periodo total de la exposición al E₂ considerando los seis tratamientos, fue de 100 días a partir del día de la eclosión y la duración total del bioensayo fue de 255 días. El muestreo para la identificación del periodo lábil fue de 12 larvas cada 5 días hasta el día 100 después de la eclosión.

Se realizó una prueba T test para los organismos de 60 y 95 DDE que estuvieron bajo la administración de estradiol y del grupo control, para establecer si existen diferencias en el crecimiento de ambos grupos.

2.3. Protocolo de cultivo para el experimento sin esteroides

En un cultivo paralelo se sembraron aproximadamente 140,000 huevos en tres incubadoras cónicas de fibra de vidrio de color azul de 2,000 l cada una. La temperatura del agua de las incubadoras se mantuvo a 18°C, con la ayuda de un equipo de aire acondicionado (Trane R22). Al día 19 después de la eclosión, las larvas fueron trasladadas a jaulas independientes de 1 m x 1 m elaboradas con tubos de PVC y malla mosquitero de 2mm de apertura dentro un tanque con el fondo color gris oscuro de 9,000 l.

Al momento del traslado de las larvas, la temperatura del agua de las incubadoras era de 19.4°C y la del tanque de 9,000 l era de 14.9°C, por lo que fueron aclimatadas lentamente dentro de contenedores de plástico de 5 l. El día 97 después de la eclosión se separaron 300 organismos para continuar con el experimento. El tanque de 9,000 l estuvo conectado al sistema de recirculación de agua oceánica del departamento de Acuicultura.

2.4. Condiciones generales para ambos cultivos

En todos los tanques se colocaron piedras difusoras para mantener una concentración adecuada de oxígeno disuelto, además de permitir una distribución homogénea del alimento y de la temperatura en todo el tanque.

Una vez que las larvas fueron trasladadas de las incubadoras a los sistemas de cultivo respectivos, no se utilizó luz artificial, ya que la luz natural se atenuó utilizando la iluminación natural provista por ventanas cubiertas con láminas de fibra de vidrio colocadas en el techo del laboratorio de peces marinos.

A partir del segundo día después de la eclosión (DDE), y hasta los 17 DDE, las larvas se alimentaron con rotíferos (*Brachionus plicatilis*). A partir del día 18 DDE se proporcionó una mezcla de rotíferos y nauplios de artemia, ambas dietas enriquecidas con una emulsión rica en ácidos grasos poliinsaturados (Algamac 3000, Aquafauna Bio-Marine). Después del día 31 y hasta el día 45 DDE, las larvas se alimentaron únicamente con nauplios de artemia enriquecidos, posteriormente los nauplios de artemia se sustituyeron en forma gradual, durante un periodo de 5 días, por una dieta formulada microparticulada (50% proteína min, 10-11% lípidos min, 3% fibra max, 16% ceniza max, 2.3% Calcio min, 1.5% Fosforo min. Otohime, Reed Mariculture, Campbell, CA), que se suministró hasta el día 75 DDE. El tamaño de la primera dieta formulada Otohime fue de 250 a 360 μm , seguida de partículas de 360 a 650 μm , y por último se suministraron partículas de 580 a 840 μm . Posteriormente y hasta el final del bioensayo, los lenguados se alimentaron con una dieta para trucha con un diámetro de 2 mm (45% proteína min, 14% lípidos min, 2.5% fibra max, 11% ceniza max. El Pedregal Silver Cup) y gradualmente se sustituyó por una dieta para peces marinos de tamaño 2.3 y 4.1mm (48% proteína min, 12 -13% lípidos min, 2% fibra max, 16 - 17% ceniza max, 2.2 – 2.5% Calcio min, 1.7% Fosforo min. Otohime, Reed Mariculture, Campbell, CA). Los organismos fueron alimentados a saciedad a partir de los 97 DDE y hasta el final del experimento (255 DDE).

Diariamente se registraron la temperatura (0,1° C), la salinidad (0.01 ‰ de precisión) y el oxígeno disuelto (0.01 mg/l de precisión) de las unidades experimentales, usando un medidor digital (YSI, modelo 85). La concentración de amoníaco se cuantificó cada tercer día con un kit colorimétrico comercial (0.1 mg/l

de precisión, API, Canadá), así mismo, la concentración de nitritos y nitratos se analizó cada semana con un kit colorimétrico comercial (API, Canadá).

Las mediciones de la longitud total (LT) de las larvas post metamórficas y de los juveniles se hicieron con un vernier Mecanic Typ 6901, con una precisión de ± 0.05 mm.

2.5. Descripción de la génesis gonadal e identificación del sexo

Para describir el desarrollo gonadal e identificar el sexo de los organismos, se colectaron muestras de 12 larvas cada 5 días hasta el día 100 después de la eclosión. Posteriormente los muestreos se redujeron a 10 organismos cada 30 días hasta el final del experimento. Los organismos de longitud menor a 95 mm fueron procesados histológicamente con todos los tejidos corporales, mientras que a los organismos cuya longitud fue mayor a 95mm, se les disecó únicamente la región abdominal, donde se encuentran las gónadas, para quitar el resto de los tejidos que no eran objeto de estudio (Fig. 8).



Figura 8. Ubicación de la gónada con respecto a la cavidad abdominal en *P. californicus* de 159 mm. Las líneas punteadas indican la ubicación de la cavidad abdominal; la línea continua muestra la ubicación de las gónadas.

La descripción de la génesis gonadal e identificación del periodo lábil para la diferenciación sexual se hizo por medio del análisis histológico de las gónadas. Todas las muestras de larvas y gónadas fueron fijadas en solución Davidson, en un volumen de 1:5 (Apéndice 1).

Para el procesamiento histológico, las muestras se colocaron individualmente en casetes histológicos, posteriormente fueron deshidratadas en un procesador automático de tejidos (Apéndice 2), con cambios graduales de etanol, de 70% hasta alcohol absoluto, y finalmente se incluyeron en parafina mediante un incluidor de parafina (Leica GC 1160).

Los cortes histológicos se realizaron en un micrótopo Spencer 820 con un grosor de 5 micras, y fueron colocados en portaobjetos. Las laminillas se tiñeron con la técnica de Hematoxilina-Eosina/Floxina (Apéndice 3) y se montaron con resina (Luna, 1968; Kiernan, 1999). La observación de las laminillas histológicas se hizo con la ayuda de un microscopio compuesto Olympus CX31 equipado con una cámara digital Olympus C5060.

Para describir las etapas de la diferenciación gonadal en el lenguado de California, se usó un criterio histológico tomando como base los distintos tipos celulares, las relaciones entre ellos, y la diferenciación de células y órganos presentes únicamente en el ovario o en el testículo (Tabla 1).

Tabla 1. Criterios morfológicos que se usaron para clasificar y describir el desarrollo gonadal del lenguado de California durante el análisis histológico.

Características anatómicas, celulares o tisulares	
1	La ubicación del primordio gonadal o gónada dentro de la cavidad abdominal.
2	La posición del primordio gonadal o gónada con respecto al riñón.
3	Las células que caracterizan al primordio gonadal o gónada, como las células germinales primordiales, quistes (células germinales primordiales organizadas en grupos dentro de estructuras esféricas), espermatogonias u ovogonias, espermatocitos u ovocitos, y espermatozoides u óvulos.

Nota: basados en Nakamura, 1984; Yamamoto, E., 1999; Devlin et al., 2002; Luckenbach *et al.*, 2003.

Para la descripción del desarrollo gonadal, se describirá la morfología de los peces de acuerdo a: lado anterior, que corresponde a la parte donde se ubica la cabeza; lado posterior, en donde se encuentra la aleta caudal; lado ventral, parte inferior del organismos donde se ubica la aleta anal; y lado dorsal, parte superior del organismo donde se encuentra la aleta dorsal (Fig. 9).

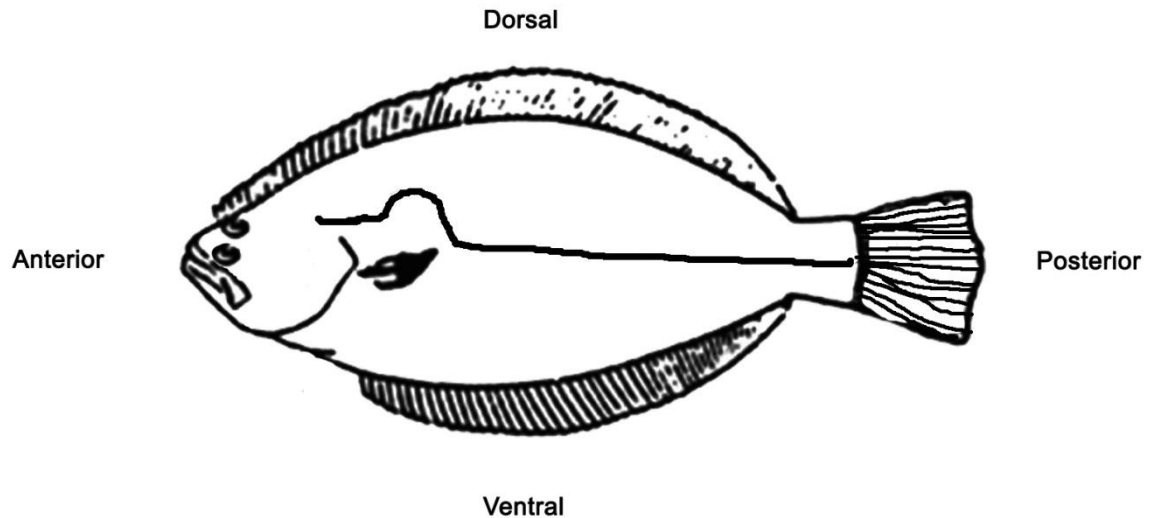


Figura 9. Diagrama de la orientación anatómica de *Paralichthys californicus* consideradas para la descripción de la génesis gonadal.

3. Resultados

3.1. Experimento con esteroides

La tasa de eclosión fue de $81 \% \pm 2.93$. La concentración media del oxígeno disuelto para cada uno de los tratamientos con estradiol y el grupo control se mantuvo en el intervalo de 6.33 a 6.54 mg/l.

La temperatura del agua ($T^{\circ}\text{C}$) se controló con un sistema de intercambio de calor, utilizando agua enfriada a 20°C . La temperatura del agua presentó una mínima de 18.4°C y una máxima de 22.8°C durante el experimento. El pH varió entre 7.87 y 7.79. La variación en las características fisicoquímicas fue pequeña debido a que todas las unidades experimentales tuvieron las mismas condiciones de cultivo (Tabla 2).

Tabla 2. Características fisicoquímicas del medio de cultivo de *Paralichthys californicus*. Valores: media \pm error estándar.

Tratamientos	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	OD (mg/l)	pH
Control	20.6 ± 0.08	6.35 ± 0.05	7.79 ± 0.03
2	20.6 ± 0.06	6.38 ± 0.06	7.84 ± 0.02
3	20.7 ± 0.07	6.33 ± 0.06	7.79 ± 0.06
4	20.6 ± 0.06	6.39 ± 0.08	7.83 ± 0.03
5	20.5 ± 0.06	6.54 ± 0.08	7.86 ± 0.03
6	20.5 ± 0.06	6.50 ± 0.06	7.87 ± 0.02

Timmons *et al.* (2010) reporta para especies de agua fría que los valores permisibles para las concentraciones de amonio total ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) deben estar por debajo de 1 mg/l, los nitritos no deben rebasar 1.5 mg/l, mientras que los nitratos deben permanecer debajo de 100 mg/l. La concentración de amonio, nitritos y nitratos total promedio de los tanques de cultivo del lenguado de California se mantuvo dentro de los valores requeridos durante el bioensayo. No existe una variación importante entre los diferentes tratamientos en cuanto a la

concentración de las características químicas, esto puede deberse a que se realizaron recambios de agua y limpieza de los tanques diariamente (Tabla 3).

Tabla 3. Características químicas para los diferentes tratamientos durante la etapa de experimentación con *Paralichthys californicus*.

Tratamientos	Amonio total (mg/l)	Nitritos (mg/l)	Nitratos (mg/l)
Ctrl	0.47 ± 0.06	0.85 ± 0.28	1.95 ± 0.56
2	0.46 ± 0.06	0.83 ± 0.28	1.94 ± 0.56
3	0.47 ± 0.06	0.84 ± 0.29	1.94 ± 0.56
4	0.47 ± 0.06	0.83 ± 0.28	1.94 ± 0.56
5	0.47 ± 0.06	0.83 ± 0.28	1.94 ± 0.56
6	0.47 ± 0.06	0.80 ± 0.28	1.94 ± 0.56

3.1.1. Sobrevivencia en el experimento con esteroides

Al inicio del bioensayo se sembraron 400 larvas por tanque en el sistema experimental. Al finalizar el experimento aplicando el estradiol, todos los organismos fueron sacrificados y fijados, sin embargo, no se llevó a cabo un conteo final de los mismos debido a un error en el experimento que no permitió la estimación de la variabilidad. No obstante, se realizó la estimación de la sobrevivencia en el día 66.

Debido al proceso de descomposición acelerado, al tamaño de las larvas y a la dificultad de distinguir a las larvas vivas de las muertas en el fondo del tanque, no fue posible realizar estimaciones de la mortalidad instantánea durante las primeras etapas de desarrollo. Sin embargo, se identificaron dos factores críticos que disminuyeron evidentemente la población durante la aplicación del estradiol. El primer factor fue el uso de etanol a una concentración de 0.02% para disolver el estradiol, ya que el etanol producía mucha turbiedad en el agua, al grado que se tornaba blanquecina y con la formación de una especie de nata sobre la superficie del agua, provocando un descenso en la concentración del oxígeno disuelto

durante algunos días en el tratamiento 1, y en donde se quedaban atrapadas las larvas. Por esta razón, se decidió cambiar el etanol por otro solvente mas adecuado como el dimetil sulfóxido (DMSO).

La toxicidad del DMSO en 9 especies de peces, es mucho menor a la que presenta la acetona y otras sustancias ampliamente usadas como solventes (Gaylor Chemical Company, 2007).

El segundo factor que pudo ser causante de la mortalidad de 100%, fue la elevada concentración de estradiol, ya que en estudios previos de inducción del sexo en peces planos, en los que los esteroides sexuales se han suministrado por inmersión, la concentración más alta usada fue de 10 µg/l (Yamamoto, 1999). Sin embargo, en el presente estudio se uso una concentración mucho más elevada debido a los resultados paradójicos que se reportan para *P. olivaceus*, además de considerar que para otras especies la inducción satisfactoria de hembras fue con concentraciones mayores a la que usadas en este trabajo.

Adicionalmente, Márquez – Reyes en 2009, reporta cuatro momentos críticos en el desarrollo del cultivo del lenguado de california que disminuyeron la población:

1. Durante y al término de la absorción del saco vitelino.
2. Cuando los organismos abrieron la boca y comenzaron a comer (primera alimentación exógena).
3. Durante la metamorfosis.
4. Al comienzo del destete, cuando se sustituyó el alimento vivo por una dieta microparticulada.

Durante el bioensayo se eliminó el tratamiento 1 que comprendía del día 0 al día 20 después de la eclosión, debido a que los primeros días del experimento se realizaron modificaciones a los sistemas donde se encontrarían las larvas y no

se contó con otro desove para repetir este tratamiento del bioensayo. Así mismo, la duración de los tratamientos no fue constante, es decir, no tuvieron una duración homogénea de 20 días, y el traslape entre los tratamientos no fue de 5 en todos los casos, todo esto debido a que se tuvieron algunos contratiempos con el experimento y el sistema.

En la Tabla 4 se muestran los porcentajes de la sobrevivencia de los diferentes tratamientos y el grupo control en el día 66DDE. Para el día 66 DDE se observa que la mortalidad fue mayor en los tratamientos 2 y 3, posiblemente se debió a que las larvas tenían de 20 a 50 días después de la eclosión, y que fue el periodo que coincidió con el proceso de metamorfosis.

Tabla 4. Sobrevivencia en porcentaje de los tratamientos en el día 66 después de la eclosión.

Tratamiento	Periodo de exposición al estradiol (DDE)	Desarrollo	Sobrevivencia
2	22 – 40	Metamórficas	2.41%
3	41 – 60	Postmetamórficas	0.91%
4	50 – 70	Postmetamórficas	18.33%
5	69 – 89	Postmetamórficas	29.5%
6	88 – 95	Postmetamórficas	29.4%
Control	-	-	28.6%

3.2. Experimento sin esteroides

La duración total del bioensayo fue de 255 días, y las larvas tuvieron una tasa de eclosión del $87 \% \pm 4.16$. La temperatura promedio del agua ($T^{\circ}\text{C}$) en el tanque de 9,000 l fue de 16.2 ± 0.19 . Timmons *et al.* (2010) y Moksness *et al.* (2004) mencionan que el nivel de oxígeno disuelto (OD) de 5 mg/l es considerado aceptable en los organismos acuáticos, en este cultivo se presentan niveles entre 6.81 y 7.03 mg/l. Así mismo, Timmons *et al.* (2010) reportan que la concentración de amonio total, nitritos y nitratos deben estar por debajo de 1 mg/l, 1.5 mg/l y 100 mg/l respectivamente. Las concentraciones químicas de este cultivo están dentro de los valores sugeridos para las especies acuáticas, además que el tamaño del

tanque y la poca densidad de organismos fueron favorables para mantener las condiciones estables para el cultivo (Tabla 5).

Tabla 5. Características fisicoquímicas para el cultivo en el tanque de 9,000 l. O.D.: Oxígeno disuelto; E.E: Error estándar; f: fuera de la jaula; d: dentro de la jaula; t: tanque; j1: jaula 1.

Parámetros	Media	Mínimo	Máximo	E.E.
T°C f	16.28	13.80	18.90	0.19
T°C d	16.12	13.60	18.90	0.31
OD t	7.03	5.44	8.60	0.13
OD j1	6.81	5.42	7.80	0.11
Amonio t	0.10	0.00	0.25	0.03
Amonio j1	0.10	0.00	0.25	0.03
Nitritos t	0.00	0.00	0.00	0.00
Nitritos j1	0.00	0.00	0.00	0.00
Nitratos t	2.84	0.00	10.00	0.69
Nitratos j1	3.04	0.00	10.00	0.68

3.2.1. Supervivencia en el experimento sin esteroides

La supervivencia para este experimento presentó las mismas dificultades para estimar la mortalidad instantánea que el experimento con esteroides, sin embargo de los 300 organismos separados al inicio del experimento, únicamente se registró un 1.66% de mortalidad, que equivale a 5 organismos muertos, las muertes fueron por accidentes al momento de llevar a cabo la limpieza de la jaula y el tanque. En el día 255, cuando se terminó el bioensayo, se sacrificaron y fijaron 30 organismos, los cuales fueron procesados histológicamente para cuantificar la proporción sexual.

3. 3. Descripción de la génesis gonadal e identificación del sexo

Para realizar la descripción de la génesis gonadal, se procesaron histológicamente 105 organismos con edades entre 29 y 255 DDE.

Los primeros cortes histológicos que se realizaron fueron en organismos que tenían 29 DDE, ya que Márquez – Reyes (2009) observó que en organismos post metamórficos de 46 DDE el primordio gonadal ya se puede observar entre los conductos mesonéfricos y el tracto digestivo.

Al inicio de la gametogénesis, las células germinales primordiales presentaron características morfológicas similares entre sí: las gonias, que posteriormente se diferenciarán en espermatogonias u ovogonias, son células esféricas con núcleo, que se dividen por mitosis y dan origen a grupos de células (espermatocitos u ovocitos primarios) que continúan dividiéndose para después dividirse por meiosis, y originar espermatocitos u ovocitos secundarios (Fig. 10).

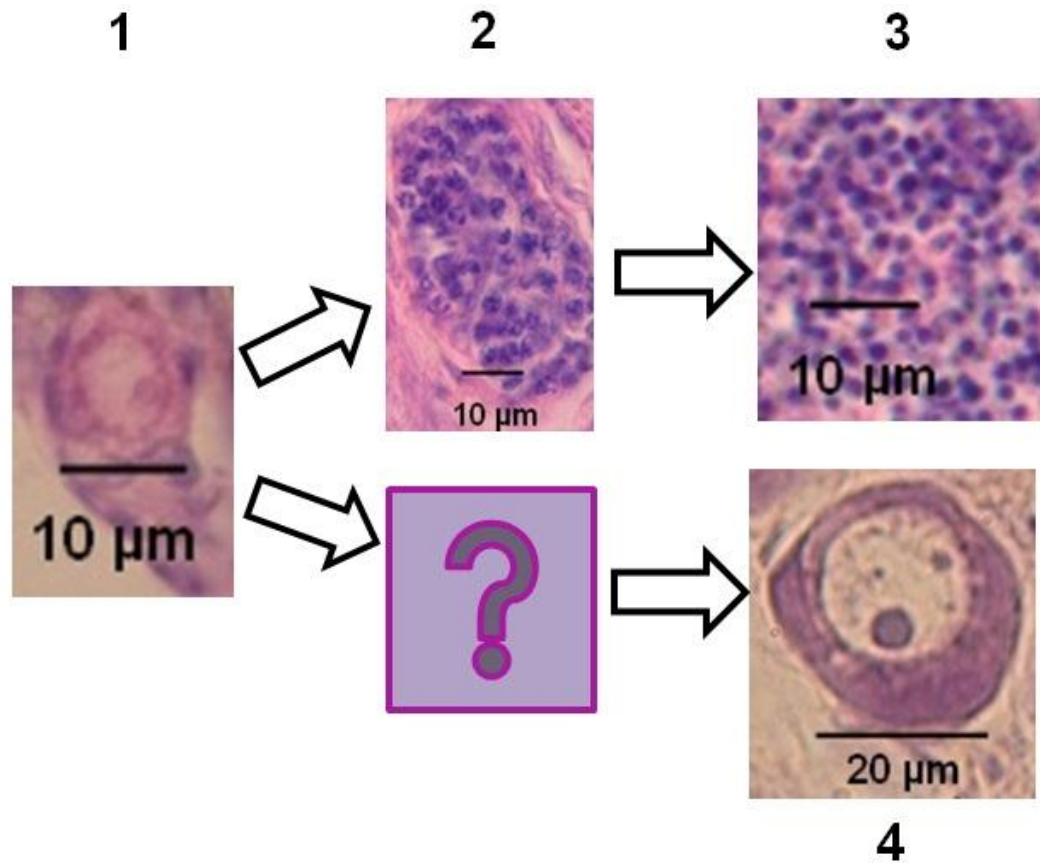


Figura 10. Proceso de gametogénesis en *P. californicus*. 1. Célula germinal primordial, 2. División celular (Mitosis o Meiosis), 3. Espermatocito primario, en las hembras no se observó el estadio correspondiente, 4. Ovocito.

A pesar de que todos los lenguados que se cultivaron provenían de un solo desove y por lo tanto tenían la misma edad, su longitud total fue variable. El tamaño de las gónadas de los organismos de la misma longitud en los diferentes tratamientos, fuer similar, por lo que su estructura histológica y su composición citológica se describe de forma progresiva con respecto a la longitud total del cuerpo y la edad, indicada como días después de la eclosión (Tabla 6 y Fig. 11).

Tabla 6. Resumen de eventos morfológicos del desarrollo gonadal y diferenciación sexual de *P. californicus*.

Edad (DDE)	Long (mm)	No. Muestras	Etapas gonadales
29*	9 a 10	3	Primordio gonadal con 1 CGP
34	8 a 9	5	-
39*	15 a 19	3	Incremento del número de CGP
40	8	1	-
60*	22 a 35	6	Gónada con crecimiento longitudinal
95	47 a 61	11	-
97*	30 a 88	18	Inicio de formación de lóbulos con gonias
104	54 a 73	5	-
128*	64 a 99	3	Lóbulos con gonias
158*	72 a 104	10	Inicia división meiótica y aparición de espermatocitos en machos, aparición de la cavidad ovárica en hembra
189*	70 a 130	5	Gónada con espermatocitos primarios y Secundarios
220*	89 a 142	5	Gónada con espermatocitos primarios y Secundarios
255*	95 a 193	30	Ovario y testículo bien diferenciado

*Muestras que se usaron para realizar la descripción gonadal

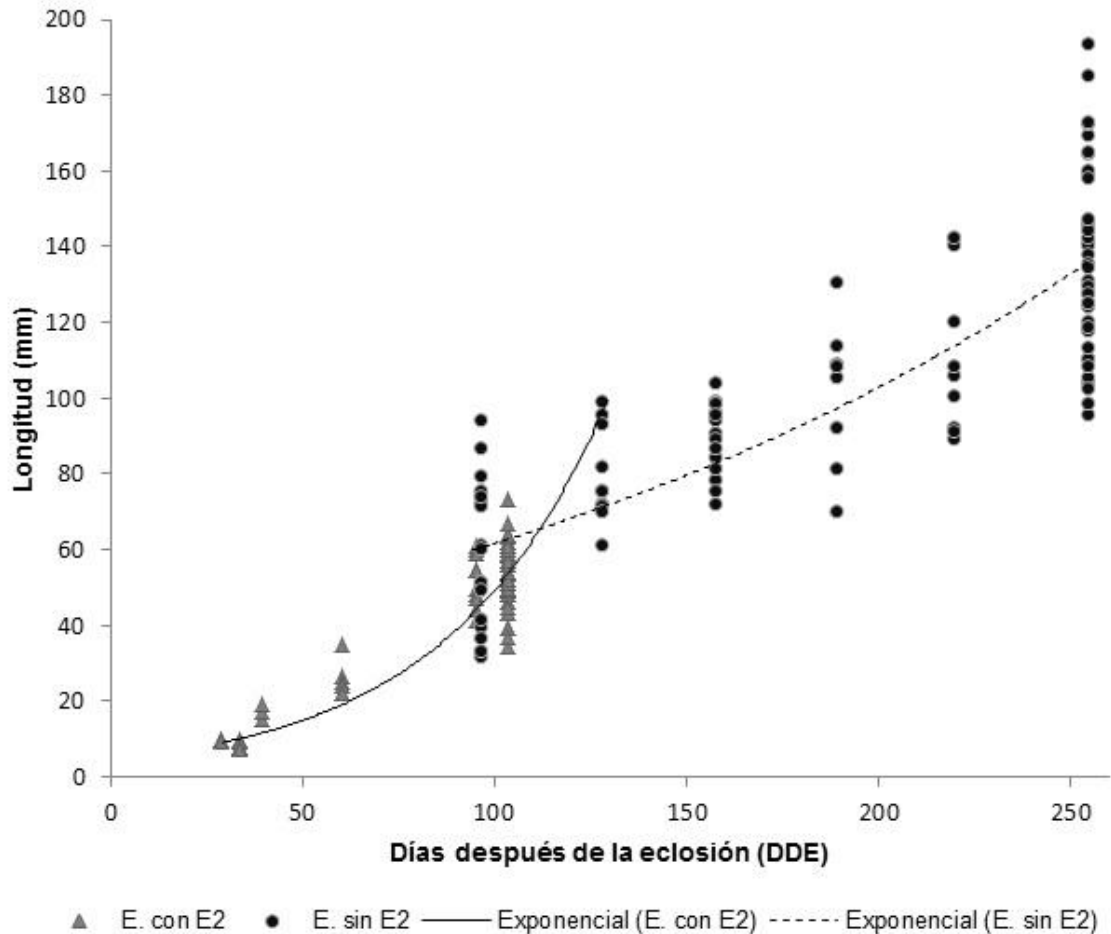


Figura 11. Longitud total promedio (mm) y edad en días después de la eclosión del lenguaje de California *P. californicus* cultivados en dos condiciones diferentes en el laboratorio (E. con E2: grupo control del experimento con esteroides; E. sin E2: experimento sin esteroides).

3.3.1. Longitud de 9 a 10 mm (29DDE)

En las larvas de 9 a 10 mm, el primordio gonadal tenían un parecido a una cresta de forma ovalada, derivada del mesenterio, ubicada a ambos lados de la línea media de la región dorsal posterior de la cavidad abdominal, y en la posición posterior con respecto al riñón (Fig. 12.A). En este estadio de desarrollo la gónada contiene una célula germinal primordial (CGP) por sección transversal, rodeada por 4 o 5 células somáticas con escaso tejido conectivo. La CGP son células grandes ligeramente ovaladas, de 9 a 11 μm de diámetro, con un poco de citoplasma y un núcleo redondo, de 4 a 5 μm de diámetro, tiene un nucléolo

evidente (Fig. 12. B). El primordio gonadal se dispone hacia el interior de la cavidad, en contraste con el riñón que tiene una ubicación retroperitoneal, es decir, se encuentra fuera del peritoneo.

3.3.2. Longitud de 15 a 19 mm (39DDE)

En las larvas de 15 a 19 mm la gónada tiene forma de pera, con 3 CGP por sección. Las características histológicas generales de las CGP fueron similares a las CGP de las larvas de 9 a 10mm. No se encontraron indicios de división mitótica, aun cuando el número de CGP aumentó.

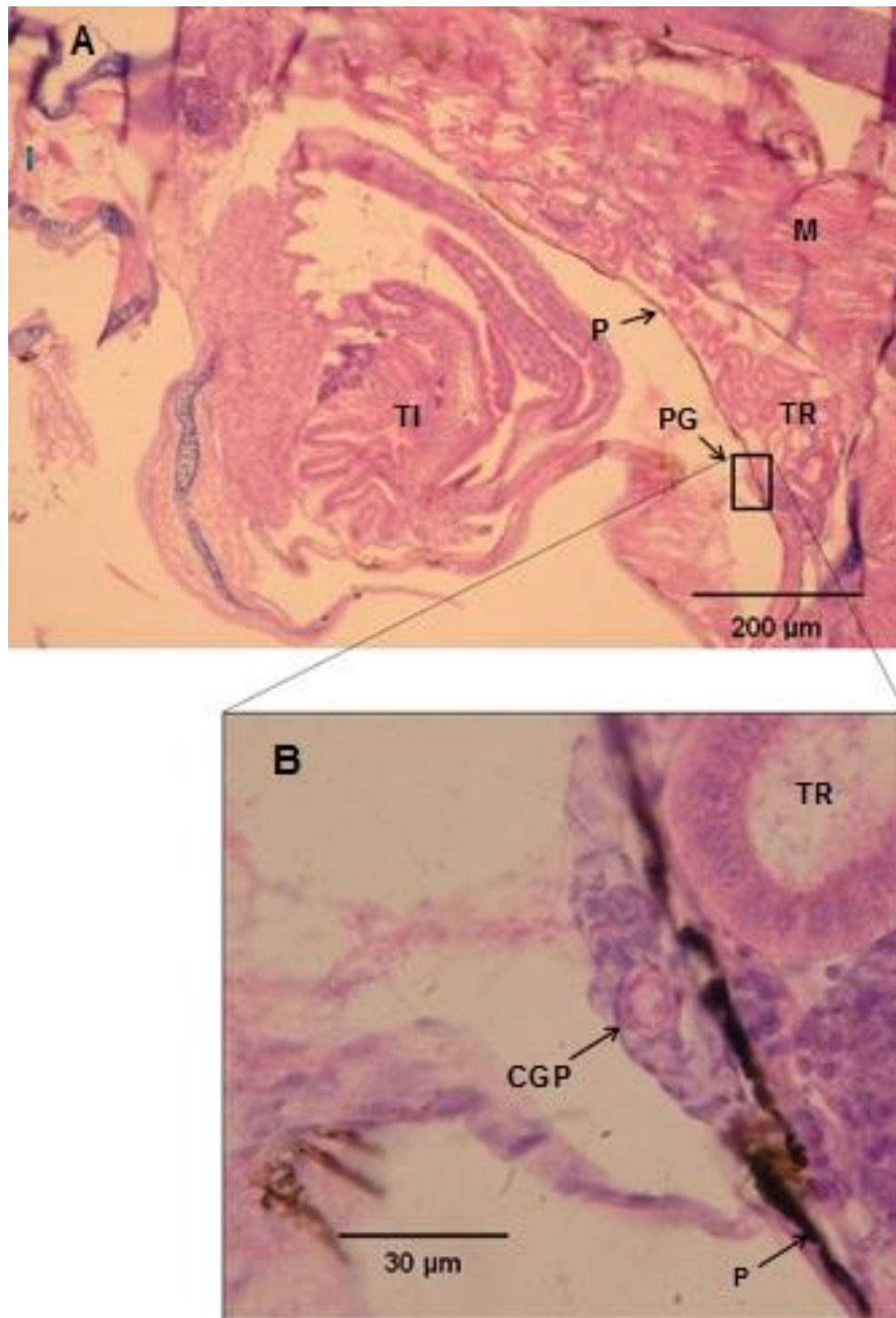


Figura 12. Gónada de *Paralichthys californicus* de 9 mm de longitud. A. Vista lateral de un corte histológico. B. Primordio gonadal con una célula germinal primordial. TR tejido renal; CGP célula germinal primordial; P peritoneo; TI tejido intestinal; PG primordio gonadal; M músculo.

3.3.3. Longitud de 22 a 35 mm (60DDE)

Para las larvas de longitud entre 22 a 35 mm, la gónada creció longitudinalmente, sin embargo el número de CGP permaneció igual que en las larvas de 15 a 19 mm. El tejido conectivo es abundante y contiene tejido vascular con pequeños capilares que se encuentran cercanos a las CGP. En esta etapa se presentaron muchas células epiteliales de revestimiento (Figura 13).

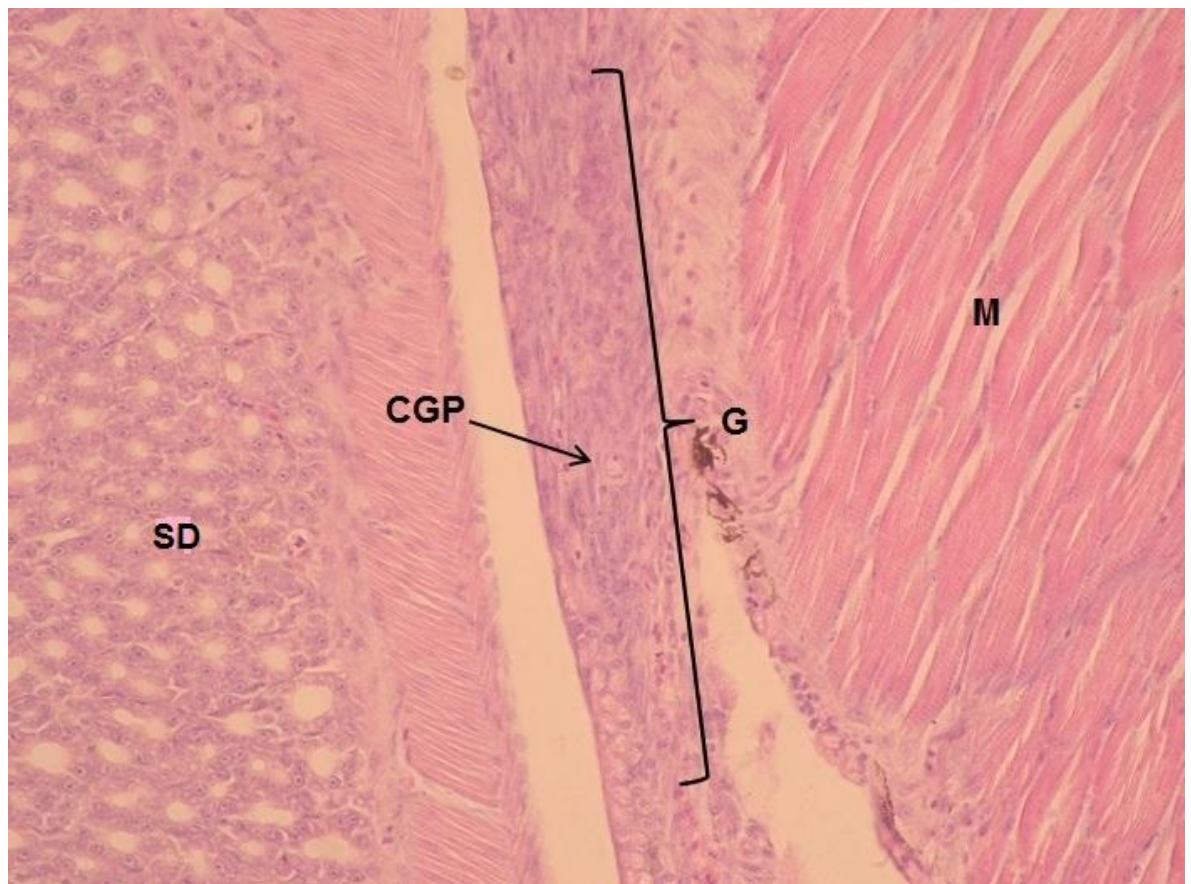


Figura 13. Gónada de *Paralichthys californicus* de 35 mm de longitud. SD sistema digestivo; CGP célula germinal primordial; G Gónada; M músculo.

3.3.4. Longitud de 47 a 61 mm (97DDE)

En organismos de 47 a 61 mm aparecen grupos de gonias (GO), que forman lóbulos. Las gonias son células redondeadas, de 5 a 6 μm de diámetro y con un núcleo redondo, los nucléolos están presentes, sin embargo son menos evidentes. Dentro de cada lóbulo se observaron de 2 a 4 GO rodeadas por células somáticas y tejido conectivo (Fig. 14). Las trabéculas, son estructuras que se extienden desde la envoltura del testículo hacia el interior de éste, fueron muy claras y constituyen la separación entre los lóbulos. Se observaron células epiteliales de revestimiento alrededor de la gónada. En estas larvas las gónadas se separan más claramente del peritoneo, pero se mantienen unidas por el mesogonadium (Colombo *et al.*, 1996). El mesogonadium es delgado, formado por tejido conectivo compacto y células epiteliales, que mantiene unida a la gónada con la pared de la cavidad abdominal.

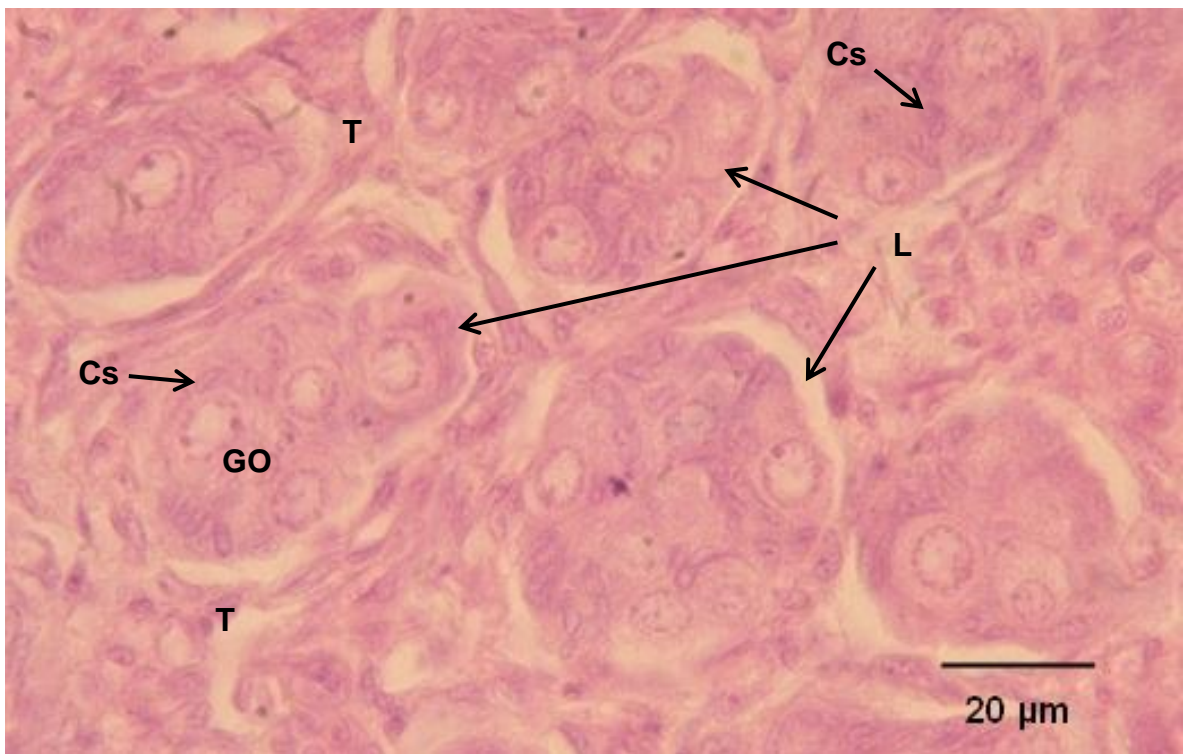


Figura 14. Gónada indiferenciada del lenguado de California, *Paralichthys californicus* de 73 mm de longitud. L lóbulos; GO gonias; T trabéculas; Cs Células somáticas.

3.3.5. Longitud de 64 a 99 mm (128DDE)

La morfología de la gónada de los organismos de 64 a 99 mm fue muy similar a la etapa anterior. Las dos características que distinguen a este estadio son el tejido gonadal que fue aun más elongado que en los estadios anteriores y un aumento en el número de las GO por sección del lóbulo. Cada sección del lóbulo contenía entre 4 y 10 GO. En esta etapa, la gónada ya se encontraba ubicada por debajo del tejido renal. Hasta esta etapa se consideró que las gónadas estaban indiferenciadas.

3.3.6. Longitud de 72 a 104 mm (158DDE)

Aproximadamente alrededor de los 95 mm, las gónadas se diferenciaron en ovarios o testículos, las gonias se transformaron en ovogonias (OOG) y espermatogonias (EPG) respectivamente. En esta etapa el proceso de diferenciación es gradual, ya que una zona de la gónada aún está indiferenciada (Fig. 15A). En el testículo el tejido germinal se encontró en diferentes estadios de desarrollo, entre espermatogonias con un diámetro de 6 a 8 μm , espermatogonias en división y espermatocitos primarios (Fig.16). Las espermatogonias fueron de tamaño similar a las CGP, sin embargo algunas estaban rodeadas por células somáticas polimórficas más oscuras, que es probable se convertirán en las futuras células de Sertoli.

El ovario se identificó por la aparición de la cavidad ovárica, por la forma ovalada de las ovogonias y su aumento de diámetro entre 17 y 20 μm , con un citoplasma ligeramente basófilo con pequeñas inclusiones oscuras, y un núcleo grande con nucléolos (Fig. 15B). En el estroma gonadal, que se refiere a la matriz extracelular, se pudieron observar algunas células somáticas, caracterizadas por un citoplasma con un núcleo redondeado, es posible que estas células sean productoras de esteroides, como las descritas en las gónadas de otros peces

teleósteos (Nakamura y Nagama, 1998). También se observó tejido conectivo y epitelial en el ovario y el testículo.

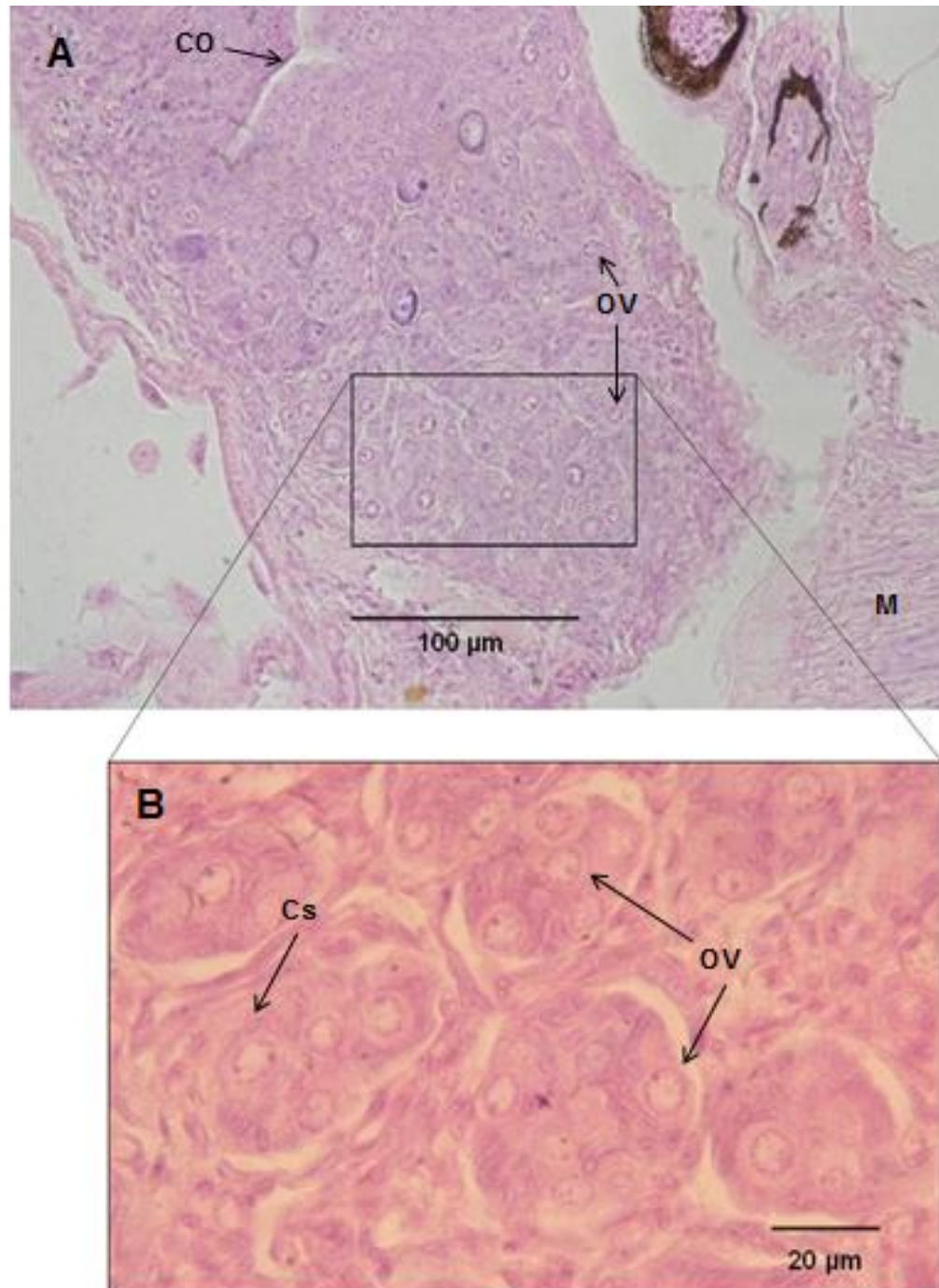


Figura 15. Ovario de *Paralichthys californicus* de 94 mm de longitud. A. Porción del ovario con ovogonias y cavidad ovárica. B. Porción del ovario que aun tiene sitio indiferenciado. CO cavidad ovárica; M músculo; OV Ovogonias; Cs Células somáticas.

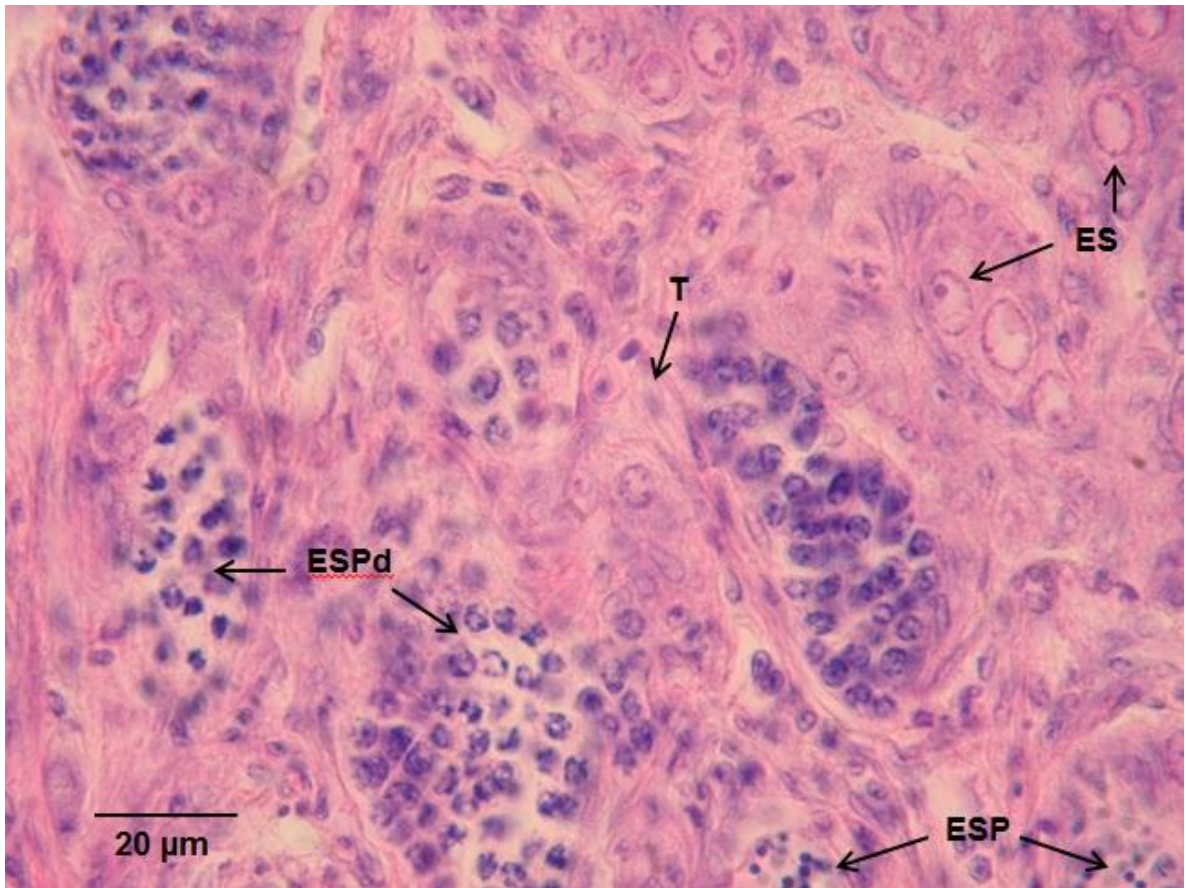


Figura 16. Testículo de *Paralichthys californicus* de 98 mm de longitud. ES espermatogonias; ESP espermatocitos; ESPd Espermatocitos en división; T trabéculas.

3.3.7. Longitud de 70 a 130 mm (189DDE)

Todos los lenguados de 70 a 130 mm procesados para su análisis histológico fueron identificados como machos. La mayoría de los lóbulos se encontraban llenos de espermatocitos primarios y secundarios, estos últimos de un diámetro menor. En esta etapa se observaron gran número de espermatocitos primarios en división. En algunos lóbulos aun se encontraban algunas espermatogonias, los lóbulos se encontraban bien definidos y rodeados por trabéculas de tejido conectivo (Fig.17). Es importante mencionar que en de cada grupo, se registró variabilidad en los organismos, tanto en longitud, peso, coloración, etc. Para el día 189, los lenguados tenían una longitud entre 70 mm (que se encontraban en el intervalo de las longitudes de los dos estadios anteriores), y 130 mm. El patrón de

pigmentación también fue muy variable, desde color café oscuro similar a los observados en organismos silvestres, hasta patrones manchados y los totalmente albinos. El peso, al igual que la longitud varió, los lenguados tenían un peso entre 3 y 29 g, y se traslapó con el intervalo de pesos de etapas posteriores.

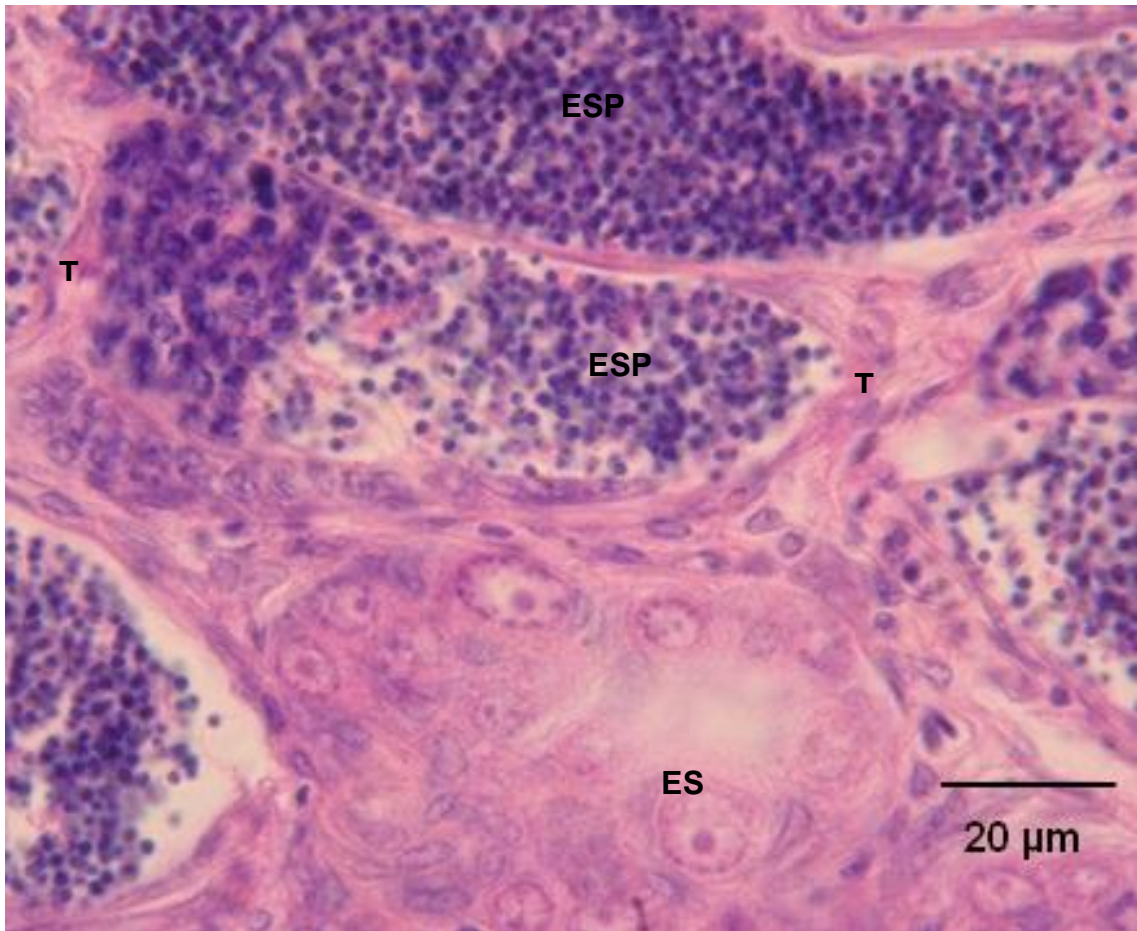


Figura 17. Testículo de *Paralichthys californicus* de 109 mm. ES espermatogonias; ESP espermatocitos; T trabéculas.

3.3.8. Longitud de 74 a 161 mm (220DDE)

En esta etapa, al igual que en la anterior, no se pudieron identificar hembras, únicamente se observaron machos en las muestras procesadas, los testículos se caracterizaron por el predominio de células de división y, espermatocitos primarios y secundarios. En algunas regiones del testículo se observaron escasas

espermatogonias. Alrededor del testículo se pudo identificar claramente la túnica albugínea, que esta formada por tejido conectivo fibroso compacto.

3.3.9. Longitud de 104 a 193 mm (255DDE)

En la longitud de 104 a 193 mm, se disecaron 30 lenguados, de los cuales 7 fueron hembras y 23 machos. En las hembras se pudo observar el ovario unido a la pared de la cavidad abdominal por el mesovario, que está constituido por tejido conectivo (Fig.18A). El ovario contiene ovocitos previtelogénicos, de varios tamaños, todos con abundante citoplasma basófilo homogéneo, con áreas claras, un núcleo redondo con nucléolo grande y un número reducido de pequeños nucléolos periféricos (Fig.18B). Los ovocitos se encuentran envueltos por una capa delgada de células foliculares. En algunos ovocitos, en posición adyacente a la capa folicular, se observan células tecales, que se caracterizan por su forma irregular y el citoplasma oscuro. Alrededor de los grupos de ovocitos y células foliculares, se observan láminas delgadas de tejido conectivo con fibroblastos y vasos capilares pequeños. La cavidad ovárica en esta etapa fue muy evidente.

En el testículo, los lóbulos seminales están bien definidos y se observa la luz del conducto. Dentro de los lóbulos se encuentran grupos de células, que probablemente correspondían a espermatoцитos primarios o secundarios. Los testículos están unidos a la pared abdominal por el mesorquio. En la región distal del testículo se observaron los conductos deferentes ocupados con numerosos espermatozoides (Fig.19).

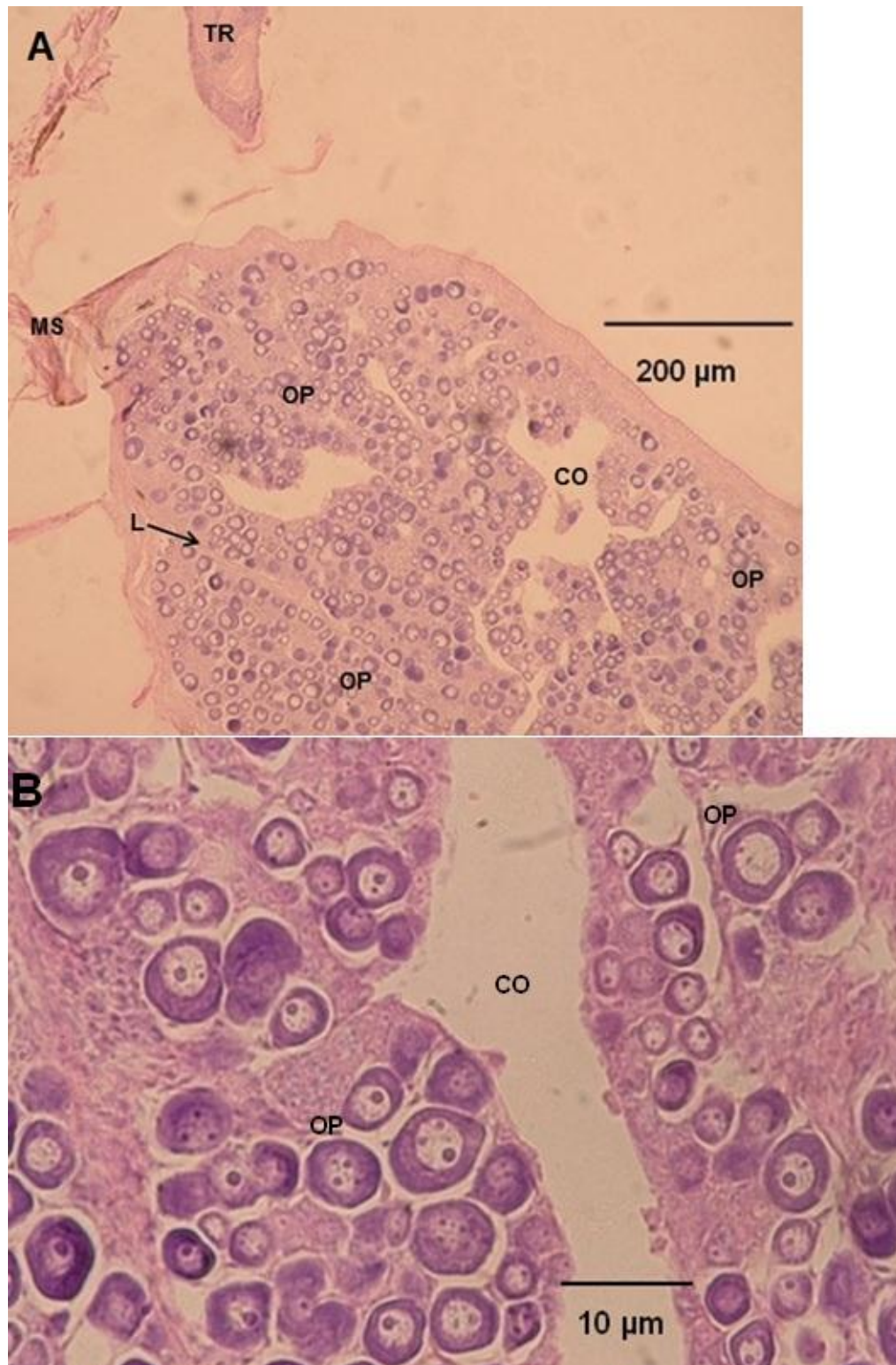


Figura 18. Ovario de *Paralichthys californicus* de 142 mm. A. Porción del ovario unido al mesovario. B. Ovocitos previtelogénicos y cavidad ovárica. OP ovocitos previtelogénicos; CO cavidad ovárica; TR tejido renal; MS mesovario; L lamelas.

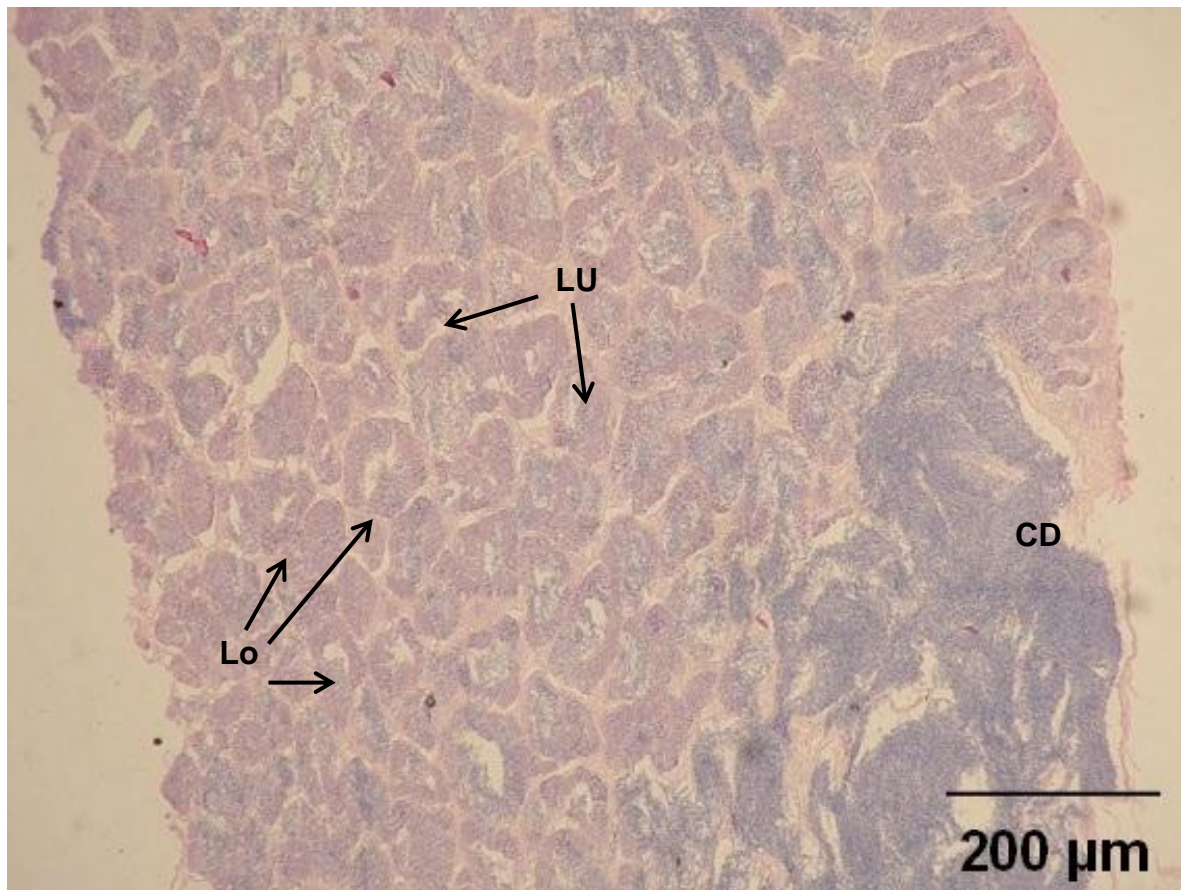


Figura 19. Testículo de *Paralichthys californicus* de 158 mm de longitud. Lo lóbulos; LU luz del lóbulo; CD conducto deferente.

Los análisis histológicos de las gónadas de los lenguados de día 255 DDE indican que la proporción sexual es de 16% de hembras y 84% de machos (0.19H:0.81M), mostrándose en la tabla 7 la proporción sexual encontrada en el cultivo sin esteroides.

Tabla 7. Proporción sexual de los juveniles de *Paralichthys californicus* cultivados hasta el día 255 después de la eclosión

DDE*	Machos	Hembras	N
158	9	1	10
189	5	0	5
220	5	0	5
255	23	7	30
Total	42	8	50

*DDE: Días después de la eclosión

3.4. Posición de la gónada en el lenguado de California

Las gónadas de *Paralichthys californicus* son pareadas de coloración blanco- amarillo, con una forma característica de Y recostada, tienen una prolongación hacia la parte posterior del pez (Fig. 20). Cuando los organismos miden aproximadamente 140 mm, se observa una cavidad en la parte posterior de la cavidad abdominal, que alberga la prolongación de la gónada. A partir de los 95 mm de longitud total, al disecar la cavidad abdominal es posible visualizar la gónada sin la ayuda de un microscopio estereoscópico.



Figura 20. Diseción de un ovario de *Paralichthys californicus*.

La ubicación de la gónada en el lenguado de california tiene un lugar muy característico, se encuentra en la parte ventral posterior de la cavidad abdominal, estrechamente ligada por tejido conectivo a la región terminal del riñón (Márquez – Reyes, 2009), mostrada en la figura 21.

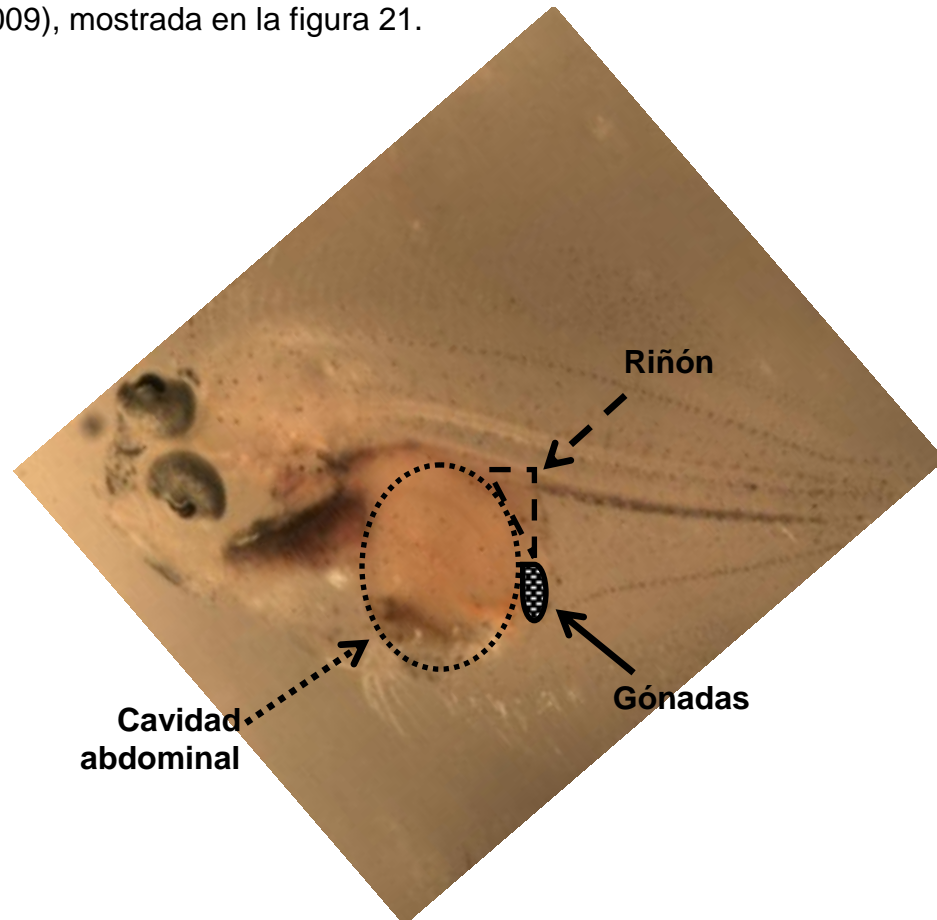


Figura 21. Ubicación de la gónada con respecto al riñón y la cavidad abdominal en una larva de *P. californicus* de 34 DDE.

3.5. Inducción del sexo de *Paralichthys californicus* con 17 β estradiol

La aplicación de E₂ en los organismos no produjo cambios en la proporción sexual, sin embargo se produjeron gónadas amorfas.

Los tratamientos 2 y 3 presentaron mortalidades del 100% durante los primeros días de la aplicación del E₂.

Al efectuar la disección de 5 organismos de los tratamientos 4 y 5, se observó que tenían una menor longitud con respecto a los del grupo control (Tabla 8 y Figura 22). Los resultados de la prueba t para los organismos de 60 DDE bajo tratamiento con estradiol fueron ($P < 0.01$), mientras que para el grupo control fue de ($P < 0.05$); Para los organismos de 95 DDE bajo tratamiento con estradiol y del grupo control fueron ($P < 0.001$).

Sin embargo, el desarrollo gonadal fue precoz, es decir, que el tamaño de la gónada era grande para el tamaño del organismo. Es posible que la aplicación del estradiol disminuyera la tasa de crecimiento de los organismos, pero no el desarrollo gonadal.

Tabla 8. Longitud total (mm) de los lenguados de California expuestos al estradiol (E_2) y el grupo control a los 60 y 95 días después de la eclosión.

Tratamiento	Long (mm)	No. de muestras	DDE*	E.E
Control	27.7	3	60	3.84
E_2 Trat. 4	23.7	3	60	0.88
Control	55.4	5	95	2.40
E_2 Trat. 5	48.6	5	95	3.24

*DDE – Días después de la eclosión; Trat.: tratamiento; E.E.: Error estándar

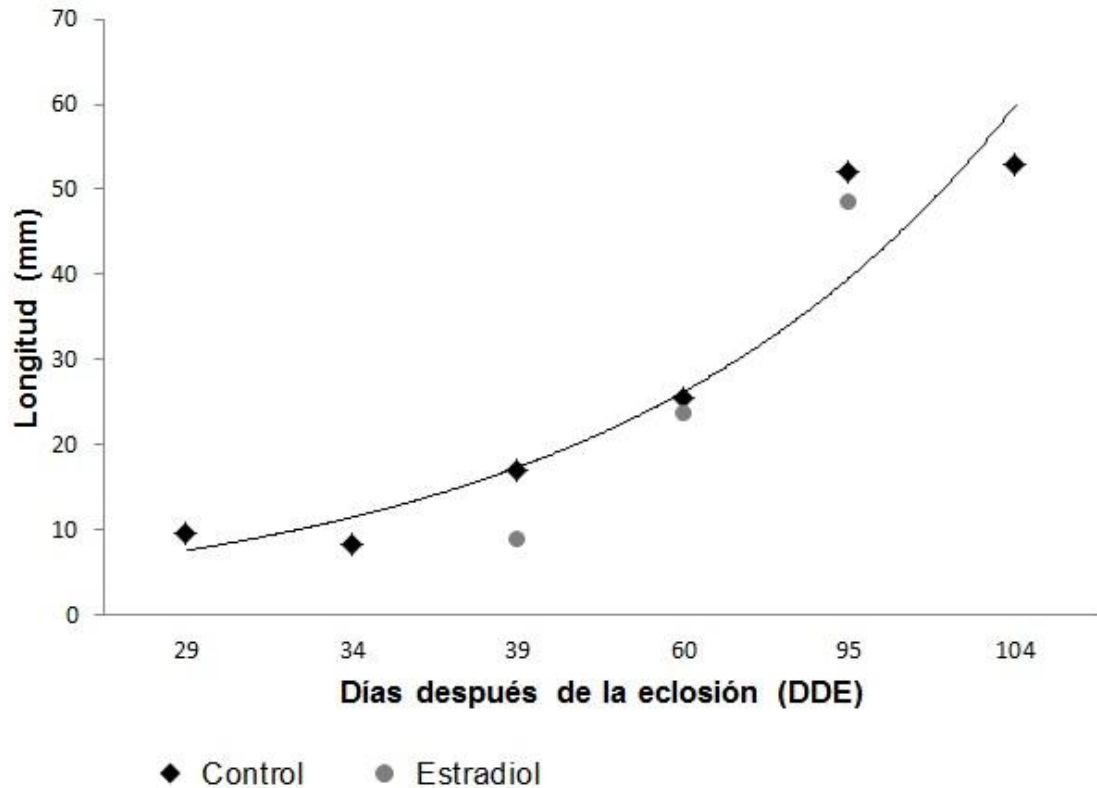


Figura 22. Longitud total (mm) de los lenguados de California del grupo control y los expuestos al estradiol (E2). Los rombos negros indican los organismos del grupo control, y los círculos grises indican los organismos del grupo expuesto al estradiol.

3.5.1. Efecto del 17β estradiol en la estructura histológica de las gónadas de *P. californicus*

No pudo determinarse con claridad si la administración de $100\ \mu\text{g/l}$ de 17β estradiol, indujeron a la transformación del sexo en los juveniles de *Paralichthys californicus*. No obstante, se observaron alteraciones que no corresponden a la estructura normal de una gónada indiferenciada o diferenciada del lenguado de California.

Para los organismos del tratamiento 4, el análisis histológico indicó, que del día 40 al día 70 después de la eclosión, se observó un conjunto de células del peritoneo, y también pudo observarse un crecimiento anormal del tejido hepático

que envolvía al intestino. Sin embargo no se lograron visualizar células germinales, por lo que no hay desarrollo gonadal aparente (Fig.23).

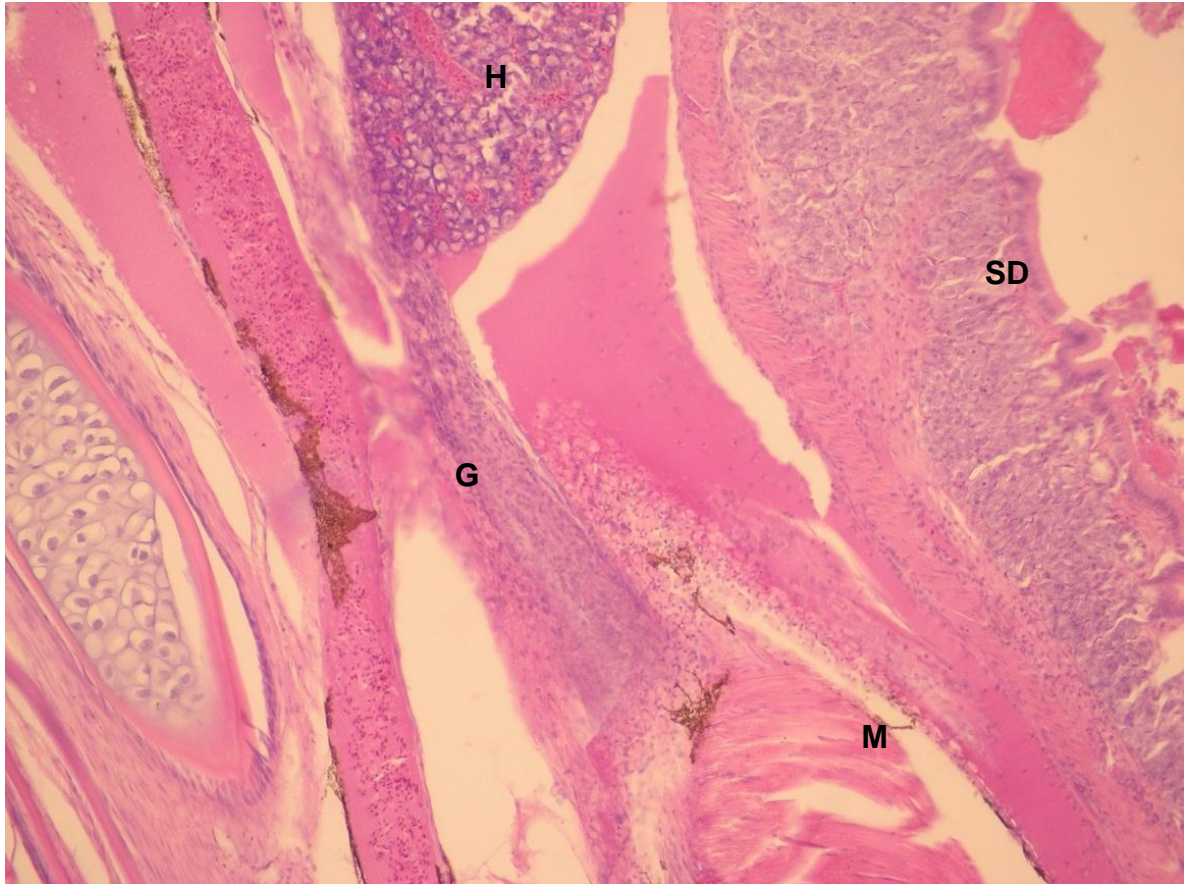


Figura 23. Gónada atrofiada de *P. californicus* de 25 mm de longitud, expuesta a 17β estradiol durante los días 50 a 70 DDE. G Gónada; M musculo; SD sistema digestivo; H hígado.

Para los organismos del tratamiento 5 (de los 69 a los 89 DDE), el análisis histológico permitió identificar las siguientes alteraciones: 1) Organismo de 44 mm, a pesar de que la estructura gonadal se asemejó a una gónada normal, se encontró muy alterada y no se pudieron identificar las células que la caracterizan. 2) Organismo de 50 mm: la gónada se encontró indiferenciada y tenía un aspecto normal, no era amorfa, ni estaba alterada, se observaron gonias (Fig. 24). 3) Organismo de 41 mm, la gónada se encontró totalmente atrofiada (Fig. 25).

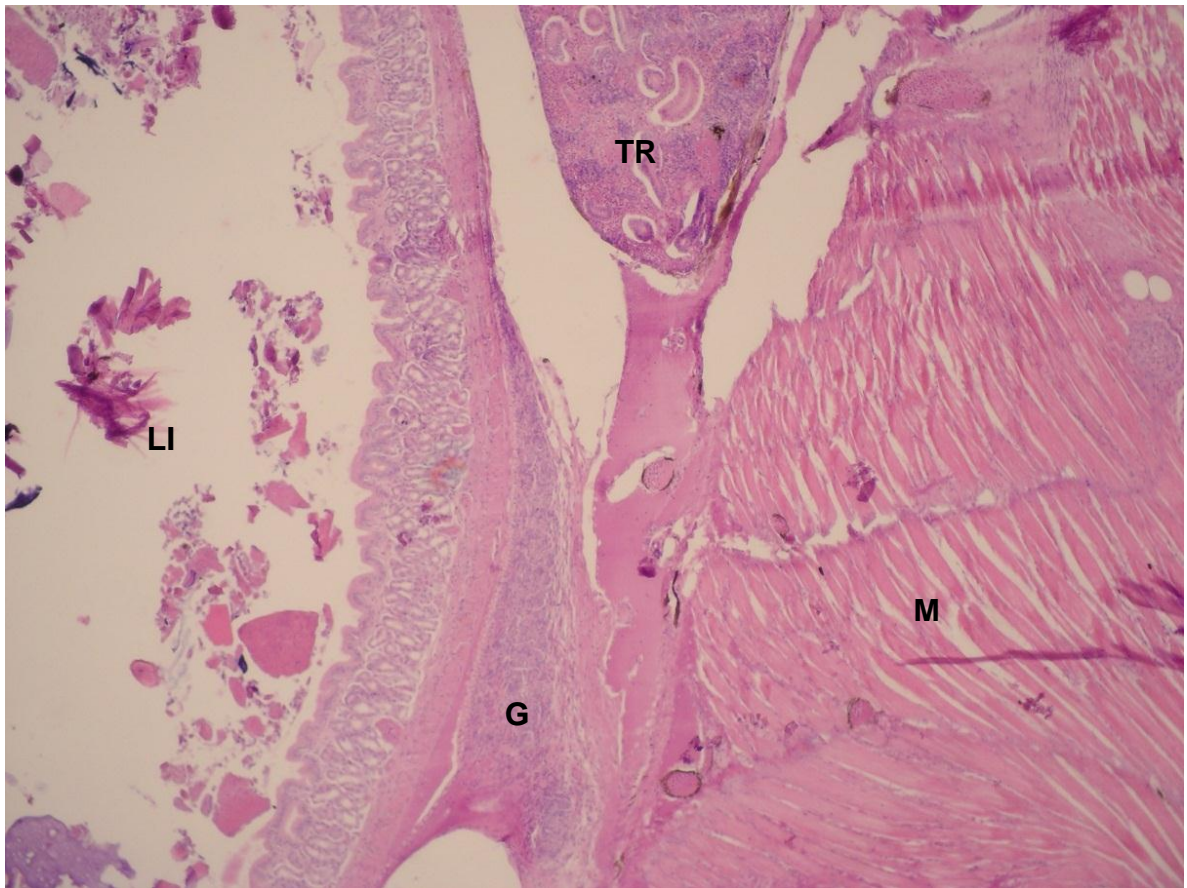


Figura 24. Gónada indiferenciada de *P. californicus* de 50 mm de longitud, expuesta a 17β estradiol durante los días 69 al 89 DE. LI Lúmen intestinal; G gónada; TR tejido renal; M músculo.



Figura 25. Gónada atrofiada de *P. californicus* de 41 mm de longitud, expuesta a 17β estradiol durante los días 69 al 89 DE. SD sistema digestivo; G gónada; TR tejido renal; M músculo.

En los organismos que fueron tratados con 17β estradiol, el tejido gonadal se observó muy alterado, con una forma irregular, su apariencia general asemeja a una gónada femenina, ya que contiene células grandes y redondas.

4. Discusión

4.1. Experimento con esteroides

Diversos autores han estudiado la diferenciación sexual en diferentes especies de peces con la aplicación de esteroides sexuales (Yamamoto, 1999; Pandian y Sheela, 1995; Nakamura *et al.*, 1998; Piferrer, 2001). Las dosis efectivas utilizadas abarcaron un intervalo entre 50 y 1000 $\mu\text{g/l}$ para inducir a la feminización, usando diferentes estrógenos (principalmente 17β estradiol) y suministrándolo a través de diferentes vías, ya sea empleando el método de inmersión (Devlin *et al.*, 2002) o a través del alimento (Piferrer, 2001). Yamamoto (1999) reportó que la aplicación de 17β estradiol por inmersión a una dosis entre 1 y 10 $\mu\text{g/l}$ no fue efectivo para la inducción de hembras en *P. olivaceus*. Para *P. californicus* la aplicación de 100 $\mu\text{g/l}$ provocó que las gónadas se atrofiaran, sin embargo no se logró la inducción de hembras.

La temperatura es un factor clave en el control de la reproducción para las especies con determinación sexual dependiente de la temperatura (TSD), ya que además de ser un factor crítico en el proceso de diferenciación del sexo, también regula la maduración sexual. Por ejemplo, si la temperatura del agua se mantiene por arriba de los 17°C por periodos prolongados, las hembras del lenguado de California dejan de producir huevos (Cadell, 1990). Los lenguados del género *Paralichthys* son los únicos que presentan proporciones sexuales sesgadas. A temperaturas bajas y altas se produce mayor número de machos; mientras que a temperaturas intermedias la proporción sexual se aproxima a 1:1 (H:M). Para *P. olivaceus*, las temperaturas en las que se han producido mayor número de machos son las menores a 15°C , y entre 25 y 27.5°C , mientras que entre 17.5 y 22.5°C el número de machos disminuye y el número de hembras aumenta (Yamamoto, 1999). Para *P. lethostigma*, la temperatura en donde la proporción sexual no difirió de 1:1 fue a 23°C , y para 18 y 28°C se obtuvieron únicamente machos (Luckenbach, 2003). Para *P. californicus* se evaluaron las temperaturas

de 15, 18, 21, 24 y 27°C, obteniendo en todas una proporción sexual de 100% de machos (Márquez-Reyez, 2009). Por otro lado, las larvas de lenguado de California crecen más rápido a una temperatura de 20°C (Gadomski y Cadell, 1990); aunque los juveniles en aguas costeras experimentan durante el verano temperaturas mayores a 20°C. La temperatura superficial en el océano pueden llegar a 24°C (Kramer, 1990).

Para *P. californicus*, en el experimento con esteroides se utilizó la temperatura de $20.6 \pm 0.06^\circ\text{C}$ para todos los tanques desde el inicio hasta el final del bioensayo. Durante el periodo experimental, se registraron ligeras fluctuaciones en la temperatura del agua, debido a que parte del bioensayo se realizó durante el verano, la época más calurosa del año en esta región del país. Sin embargo, los organismos permanecieron por lapsos cortos (1 día) a temperaturas superiores a la deseada en el presente trabajo (20°C), por lo que de acuerdo a lo reportado por Gadomski y Cadell, 1990, para las temperaturas que el lenguado de California experimenta en su medio natural, no debió afectar el desarrollo del organismos. Así mismo, la temperatura de 20°C se encuentra dentro del rango de temperaturas intermedias reportadas para *P. olivaceus* y *P. lethostigma* para producir proporciones sexuales cercanas a 1:1.

En el análisis histológico de los organismos cultivados en el experimento con esteroides únicamente pudieron observarse gónadas indiferenciadas, por lo tanto, no pudieron identificarse hembras o machos.

En *Oncorhynchus kisutch*, se registró una disminución en la longitud y el peso de los organismos en relación directa con la dosis de 17β estradiol. Es posible que la aplicación de estradiol en estadios tempranos provoque una disminución en el crecimiento; sin embargo, este retraso puede ser transitorio, y por lo tanto, su efecto en un cultivo puede ser irrelevante (Goetz *et al.*, 1979). En el presente trabajo se observó que los organismos expuestos al estradiol tenían

una longitud menor a la de los organismos del grupo control. Los organismos expuestos al estradiol presentaron longitudes entre 23.7 ± 0.88 y 48.6 ± 3.24 mm; mientras que los organismos del grupo control tuvieron longitudes entre 27.7 ± 3.84 y 55.4 ± 2.40 en los tratamientos 4 (50 - 70 DDE) y 5 (69 - 89 DDE), respectivamente. No obstante, se sugiere que al terminar la exposición de los peces al esteroide se lleven a cabo biometrías posteriores para verificar que esta diferencia en la longitud no se deba a un retraso transitorio.

De acuerdo a los resultados de este trabajo, la inducción de hembras mediante la aplicación de 17β estradiol no se logró, esto pudo deberse a que la cantidad de estradiol aplicado no fue la indicada para esta especie, y a que algunos de los tratamientos no corresponden con el periodo lábil de *P. californicus*. En el cultivo sin esteroides se observó que la diferenciación del ovario o del testículo es a partir del día 158.

Los efectos del 17β estradiol sobre la mortalidad son controversiales. Por ejemplo, en *Lepomis macrochirus*, hubo un aumento en la mortalidad en los peces que posterior a la eclosión estuvieron bajo tratamiento de 50, 100, 150 y 200 mg/kg (Wang *et al.*, 2008). Mientras que para el salmón del atlántico (*Oncorhynchus kysutch*) y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), no se ha observado una relación consistente entre la administración de 17β estradiol y la mortalidad. Sin embargo, en los alevines que fueron tratados con el estrógeno, se ha registrado un incremento en la sensibilidad a condiciones adversas. Los grupos control presentaron mortalidades entre 0.5 y 1.0%; mientras que en los tratados con 100, 200 y 400 μg de 17β estradiol presentaron mortalidades de 12.5, 33.5 y 59.5% respectivamente (Goetz *et al.*, 1979).

La sobrevivencia de las larvas de *P. californicus* en el cultivo con esteroides fue variable, entre 0.91 y 29.5%. Sin embargo, la mortalidad alta también fue observada en los grupos control de este cultivo.

Las altas mortalidades que se presentaron estuvieron asociadas con los tratamientos 2 y 3, los cuales corresponden a organismos de 22 a 60 DDE, con longitudes aproximadas de 6 a 26 mm. Las mortalidades fueron de 97.59% para el tratamiento 2 (22 a 40 DDE) y 99.09% para el tratamiento 3 (41 a 60DDE). Es posible que las mortalidades se puedan atribuir a que en estas etapas las larvas son muy susceptibles a la elevada concentración de estradiol asociado a la larga exposición del mismo. De igual manera, estas etapas corresponden con los momentos críticos que reporta Márquez – Reyes (2009) que están implicados en la disminución de la población de *P. californicus* y que no tienen relación con el suministro de esteroides. Lo que sugiere que la mortalidad no solo es producto del estradiol, sino que es posible que la interacción entre el desarrollo de las larvas y las condiciones de cultivo (como la temperatura, la dieta, las características del tanque, entre otros factores) hayan influido en el aumento de la mortalidad. Cabe destacar que a pesar de registrar una alta mortalidad en el cultivo con esteroides, la tasa de eclosión fue de 81% mientras que en el cultivo sin esteroides fue de 87%, siendo poca la diferencia entre ambas.

En *P. californicus* la mortalidad más alta (100%), se presentó en el tratamiento 1 (0 a 20 DDE), donde las larvas fueron expuestas al estradiol usando etanol como solvente. Esto pudo deberse a la combinación de una dosis elevada de E_2 y a los efectos del etanol al contacto con el agua marina, que formaba una especie de nata blanquecina que además de dificultar el nado de las larvas, causaba una disminución en la concentración de oxígeno disuelto hasta 4.01 mg/l. Posteriormente, se usó el DMSO como solvente del estradiol y la sobrevivencia de los organismos de los tratamientos 2 al 6 mejoró. No obstante, no fue posible repetir el tratamiento 1 con E_2 disuelto en DMSO, ya que no se contaba con otro desove.

Para el Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), Sower *et al.* (1984) indicaron que las altas dosis de estradiol (20 mg/kg dieta) producen altas mortalidades, ya

que en altas concentraciones, el estradiol es tóxico para los peces; sin embargo, no se conoce el mecanismo que explique la toxicidad de este esteroide. Posiblemente al igual que en otros vertebrados, las altas dosis de estrógenos inhiben el funcionamiento del riñón y el hígado, además de estar involucrados en el desarrollo de neoplasia animal. No obstante, estas alteraciones no se han reportado en peces. Se puede concluir que el suministro de dosis elevadas durante tiempos prolongados resulta en mortalidades significativas en las larvas y juveniles de *P. californicus*. Por esta razón se recomienda probar dosis más bajas de esteroides, así como distintos tiempos de inmersión para encontrar la dosis adecuada para esta especie, o en forma alternativa, probar otras vías de suministro (p. ej. a través del alimento), para promover la exitosa diferenciación sexual de hembras.

Se recomienda llevar a cabo un conteo preciso de la mortalidad, específicamente en los estadios tempranos de las larvas (etapa en la que se observó una mayor disminución de la población), para entender de manera más clara los efectos que el estradiol tiene sobre los diferentes estadios del lenguado de California. Así mismo, se sugiere la realización de biometrías periódicas desde el inicio del bioensayo, para tener un seguimiento preciso del crecimiento de los organismos durante todo el experimento, y poder comparar los efectos del estradiol sobre el crecimiento. En el presente trabajo no fue posible registrar las mediciones de la mortalidad instantánea ni del crecimiento diario de los lenguados expuestos al estrógeno debido a que el diseño experimental implicaba invertir el tiempo en la limpieza de los tanques y en modificar las fallas que el sistema presentaba. De igual manera, se recomienda realizar observaciones de las larvas que se encuentren bajo exposición al esteroide para observar otros efectos secundarios como edemas, hipoplasia de vejiga natatoria, malformaciones en el esqueleto y mandíbula.

Para lograr la inducción sexual de hembras de *P.californicus*, es necesario considerar algunos factores que influyen en el protocolo a desarrollar, como el periodo de mayor sensibilidad de esta especie, el método de administración, la concentración y el tiempo de aplicación adecuada.

En cuanto al tipo de estrógeno, puede ser natural o sintético. Generalmente los estrógenos sintéticos tienen mayor efecto sobre la diferenciación sexual que los estrógenos naturales, debido a que tienen una eliminación lenta y por las diferencias en la afinidad del receptor de esteroides sexuales. El 17 α etinilestradiol y el dietilestilbestrol son esteroides sintéticos, que se han usado en varias especies y son agentes potentes para la feminización (Piferrer, 2001). Dentro de los esteroides naturales, el 17 β estradiol es el más utilizado y se ha usado en más de 15 especies pertenecientes a las familias Salmonidae, Cichlidae, Cyprinidae, Anabantidae, Poecilidae e Ictaluridae. En cuanto a sus efectos en la sobrevivencia, en general los estrógenos son conocidos por afectar la sobrevivencia de forma negativa. Sin embargo, en los tratamientos donde se utilizaron esteroides sintéticos también se produjeron mortalidades altas (Pandian y Sheela, 1995). Para el presente trabajo, se utilizó 17 β estradiol debido a su naturaleza, que tendría una mejor metabolización en los organismos y un menor efecto sobre la mortalidad, sin embargo, la mortalidad alta que reportamos no puede ser atribuida únicamente al estrógeno utilizado.

Con respecto al modo de empleo de los esteroides, existen cuatro formas de administración como la técnica por inmersión, administración en la dieta, por inyección y por implantación. El método más común es incluirlo en el alimento, ya que este es uno de los métodos más económicos, aunque tiene como desventajas que la hormona se degrada en el tracto digestivo de los organismos, su solubilidad varía de acuerdo al solvente que se usará y no se tiene un control preciso de la cantidad que cada organismo ingiere. En el presente trabajo se administró el estrógeno mediante inmersión, puesto que es el método frecuentemente usado en

especies de agua fría ya que permite tratar a los organismos antes de la etapa de alimentación y en estadios posteriores a la eclosión, tiene un costo menor que administrarlo en la dieta, aunque también tiene desventajas como el manejo de los residuos producidos (Pandian, 1995).

En referencia a la dosis, dependerá de la especie. Hay especies que requieren concentraciones muy pequeñas para lograr la feminización, con dosis entre 0.5 y 1.0 $\mu\text{g/l}$ de E_2 como en *Oncorhynchus masou* y *O.keta* (Nakamura, 1984); mientras que para alterar la proporción sexual de *O. kisutch*, se requiere una dosis más elevada, de 400 $\mu\text{g/l}$ de E_2 (Piferrer y Donaldson, 1992). En general los esteroides administrados en dosis altas y en estadios tempranos pueden ocasionar altas mortalidades, anormalidades morfológicas y esterilidad, entre otras alteraciones.

Uno de los contratiempos más relevante que se presentó durante el bioensayo en el cultivo con esteroides fue usar como primer solvente etanol, debido a que formaba una nata blanquecina que tapaba las mallas, las mangueras y el filtro con carbón activado, además de producir altas mortalidades. Debido a esto, se disminuyó la concentración del solvente de 0.02 a 0.006% para descartar que la concentración de etanol fuera la causante de la formación de la nata, sin embargo, aún con una dosis menor se presentó la misma situación. Finalmente, se optó por cambiar el solvente de etanol a DMSO, el cual no presentó la producción de la nata en el agua.

4.2. Identificación del periodo lábil para la diferenciación sexual

El periodo lábil para algunas especies, es un momento particular del desarrollo temprano que se circunscribe a un periodo previo a la diferenciación histológica del primordio gonadal (Devlin *et al.*, 2002).

En la mayoría de las especies ovíparas investigadas, la etapa del desarrollo en que el tejido gonadal es sensible, generalmente corresponde con la eclosión de peces que desarrollan durante la etapa larvaria la organogénesis y la gonadogénesis como es el caso del género *Paralichthys*. De acuerdo con los trabajos realizados en pocas especies del género *Paralichthys* y en coincidencia con los resultados obtenidos en el presente trabajo, es posible postular que el momento en el que el tejido gonadal es sensible para la diferenciación sexual, corresponde a un momento de la vida posterior a la eclosión. En este sentido, es posible que en *P. californicus*, este periodo se restrinja al periodo comprendido entre los 20 y 158DDE. Es posible que durante este periodo se pueda modificar la proporción sexual. No obstante, en este trabajo, el tratamiento con estradiol entre los días 22 y 95 no se produjeron hembras, este resultado paradójico puede ser la consecuencia de la exposición a una dosis inadecuada del esteroide.

El periodo crítico para la diferenciación sexual en *Paralichthys olivaceus* y *P. lethostigma* está caracterizado por el desarrollo de la cavidad ovárica. En *P. olivaceus* el periodo lábil ocurre alrededor del día 29 y 100 después de la eclosión o en longitudes menores a 40 mm, es decir, entre los 20 y 32 mm de longitud total, en este periodo, es cuando las temperaturas del agua o la administración de esteroides sexuales influyen en el desarrollo gonadal (Yamamoto, 1999). En *Paralichthys lethostigma*, la aparición de la cavidad ovárica ocurre entre los 75 y 100 mm de longitud, un tamaño y edad mayor respecto al momento en que esta cavidad aparece en *P. olivaceus*. (Luckenbach et al., 2003)

En el lenguado de california, no se pudo identificar el periodo lábil para la diferenciación sexual con la aplicación de esteroides, ya que no se observaron características morfológicas de hembras en los diferentes tratamientos. No obstante, el análisis histológico reveló que el desarrollo gonadal, que se caracteriza por la aparición del primordio gonadal en los organismos post metamórficos, ocurre a los 29 DDE. Este primordio se ubica en la pared dorso

lateral de la cavidad abdominal. Entre los 34 y los 128 DDE, las gónadas se clasificaron como indiferenciadas dadas sus características morfológicas. Pero a partir de los días 158 DDE, las gónadas ya pudieron diferenciarse claramente en ovarios o testículos, por la formación de la cavidad ovárica o por el desarrollo de espermatoцитos.

Con la descripción de la génesis gonadal y con el conocimiento de este proceso en otras especies de este Género, se propone que el periodo lábil se ubica entre los días 29 y 158 después de la eclosión, o entre los 8 y 104 mm de longitud total. El día 29 corresponde al momento de la aparición del primordio gonadal, mientras que el día 158 corresponde al momento en que se observó por primera vez la cavidad ovárica. Cabe mencionar, que la estructura morfológica en las gónadas indiferenciadas parece tener una estructura común que se asemeja a la formación de un testículo, ya que se observan lóbulos con gonias en su interior, sin embargo, a partir de la aparición de la cavidad ovárica en la diferenciación de hembras, la estructura común va cambiando gradualmente en el ovario.

4.3. Experimento sin esteroides

Para el cultivo sin esteroides que se realizó a una temperatura de $16.1 \pm 0.31^{\circ}\text{C}$, se obtuvieron hembras, donde la proporción sexual fue de 16% de hembras y 84% de machos.

Tomando en consideración los antecedentes sobre la diferenciación sexual de *P. californicus* (Márquez.Reyez, 2009), y los primeros resultados de los análisis histológicos derivados de este trabajo, donde las proporciones sexuales encontradas correspondían únicamente a machos, se buscó la posibilidad de analizar las gónadas de organismos juveniles de origen silvestre. Para esto se lograron obtener muestras de gónadas de Lengado de California que forman parte del estudio "Función de un sistema estuarino para subadultos y adultos del lengado de California *Paralichthys californicus*", presentada por M. en C. Anelena

Cristina Campuzano Hernández, y dirigida por la Dra. Sharon Zinah Herzka Llona del Departamento de Oceanografía Biológica del CICESE. Se procesaron 6 gónadas de organismos que fueron colectados en el Estero de Punta Banda durante octubre de 2008. Los organismos tuvieron una longitud estándar ≥ 200 mm. El análisis histológico se realizó con el objetivo de corroborar la diferenciación de hembras en el medio natural, con longitudes semejantes a los organismos cultivados en el laboratorio. El análisis histológico de las muestras dio como resultado una proporción sexual de 5 hembras y un macho. Con este resultado se pudo confirmar que las hembras se desarrollan cuando tienen una longitud inferior a los 200 mm.

Las 6 gónadas procesadas correspondían a organismos con una longitud entre 200 y 225 mm. De los organismos procesados del cultivo sin esteroides se obtuvieron 7 hembras, de las cuales una tenía una longitud de 94 mm y las otras 6 tenían una longitud entre 127 y 164 mm. La estructura del ovario de estos organismos fue semejante a la que se observó en las hembras utilizadas para realizar la descripción de la génesis gonadal. Los ovarios contenían ovocitos previtelógenicos de varios tamaños, y la cavidad ovárica en ambos casos fue muy evidente. Esto sugiere que la diferenciación de las hembras ocurre desde que los organismos tienen una longitud aproximada a los 94 mm.

4.4. Comparación entre los cultivos experimentales

El desarrollo de este estudio comprendió el cultivo del lenguado en dos condiciones ambientales relativamente diferentes, principalmente en los que se refiere al tamaño y color de los tanques, a la densidad y temperatura del agua en la que se cultivaron los organismos. El protocolo de alimentación para ambos cultivos fue el mismo (Zacarias – Soto, 2006). En un caso, el tanque tuvo una capacidad de 9,000 l, de color gris oscuro y las larvas se cultivaron a una densidad de 300 larvas/m² dentro de una jaula de malla plástica de 1x1 m, la

temperatura del agua fue de 16°C, se observó una proporción de 8 hembras y 42 machos. Mientras que para el cultivo donde los tanques tenían una capacidad de 275 l, de color azul claro, con una densidad de 400 larvas por tanque y con una temperatura de 20°C, no se pudo discernir la presencia de machos ni de hembras diferenciados, aun cuando estos organismos estuvieron expuestos por algún periodo al efecto del E₂ (exceptuando al control). Es muy probable que este resultado se deba a que este cultivo se dio por terminado al día 104, momento en el que, de acuerdo con los análisis posteriores, las gónadas de *P. californicus* se encontraban en un estadio indiferenciado. Cabe mencionar que el número de muestras analizadas para el experimento con esteroides fue de 22, mientras que para el experimento sin esteroides fue de 50 lenguados. A los 104 DDE, la longitud de los organismos indiferenciados sexualmente fue entre 39 y 73 mm, y la de los organismos que ya se habían diferenciado, como hembras o machos, tenían longitudes entre 72 y 104 mm.

En un estudio previo de *P. californicus* los organismos a los días 243 tenían longitudes entre 107 y 127 mm, y con una proporción sexual de 100% machos. Este estudio fue realizado por Marquez-Reyez (2009), en tanques de 100 l, con una densidad de 15 huevos/l, usando cinco diferentes temperaturas 15, 18, 21, 24 y 17°C; aplicando el protocolo de alimentación propuesto por Zacarías – Soto en 2006, hasta que los organismos tuvieron una longitud de 80 mm; posteriormente alimentados con un alimento para trucha hasta el final del experimento. Tomando en cuenta los resultados de este estudio, es posible que la inducción de hembras del lenguado de California se encuentre en un rango pequeño de temperatura, esto aunando a otros factores externos como el estrés.

Turner (2008) y (Luckenbach *et al.*, 2009), observaron que el color del fondo de los tanques de cultivo tiene un efecto sobre el crecimiento en las larvas de *P. lethostigma*. Los colores claros son menos favorables porque los lenguados no pueden mimetizarse con el fondo del tanque, lo que puede

provocarles una condición estresante. Contrariamente, los colores oscuros como el gris y negro son más adecuados, ya que los lenguados pueden imitar con facilidad diferentes tonalidad de gris y negro. Los juveniles de *P. lethostigma* de 94 DDE que fueron cultivados en condiciones de intensidad luminosa alta y fondos claros en los tanques de cultivo, fueron sometidos a mayor estrés elevando los niveles de cortisol. Por lo que, Turner propone que cuando los niveles de cortisol son elevados, la biosíntesis de estradiol se bloquea por la supresión de la P450 aromatasa, generando la diferenciación sexual de machos (Turner, 2008).

El fondo de los tanques donde se cultivaron los lenguados que se expusieron al estradiol era de color azul claro. En contraste, el color de los tanques donde se cultivaron los lenguados sin esteroides era de color gris oscuro. Esta condición podría haber causado un mayor estrés a las larvas, elevando los niveles de cortisol y afectando la biosíntesis del estradiol produciendo solo machos en los organismos procesados. Aunque no se tiene evidencia directa del grado de estrés de los organismos, el desarrollo en estas condiciones podría reflejar que las características generales de estos tanques son menos adecuadas. No obstante, no se descartan otras variables que también pudieron influir en el estrés de las larvas como la manipulación asociada al mantenimiento y al muestreo de los organismos y la densidad del cultivo.

Estos resultados, en donde diversos factores ambientales dan como resultado un fenotipo masculino, es probable que involucren al gen *cyp19a1a* que codifica la enzima P450 aromatasa ovárica o que incidan en alguna parte del proceso de síntesis o función de la enzima.

Una posible explicación de la diferencia en los resultados de la proporción sexual obtenida en el cultivo sin esteroides y el cultivo con esteroides se encuentra en el gen *cyp19a1a*; ya que se considera que la expresión de la aromatasa se reduce con el aumento de la temperatura, obteniéndose únicamente

machos. Debido a que la temperatura del cultivo con esteroides fue de 20.6 ± 0.06 °C, es probable que la expresión del gen se interrumpiera sin presentarse evidencia de hembras; mientras que en el cultivo sin esteroides la temperatura fue de 16.1 ± 0.31 °C, que se encuentra dentro del rango de temperaturas óptimas para la diferenciación sexual de hembras y machos en *P. californicus*.

4.5. Descripción de la génesis gonadal e identificación del sexo

La descripción de la formación del ovario y el testículo de *P. californicus*, se realizó con base en estudios de la diferenciación sexual, específicamente de especies pertenecientes al género *Paralichthys*. La formación del ovario en *P. californicus* cultivado en laboratorio era desconocido, dado que en el estudio previo realizado por Márquez-Reyes, no se observó la presencia de hembras. Es por esto, que se recurrió a la información existente para la descripción gonadal del ovario en *P. olivaceus* y *P. lethostigma*.

En las larvas de *P. olivaceus* es posible discernir entre el tejido ovárico y el testicular cuando tienen una longitud de 27 a 37 mm (Yamamoto, 1999). Mientras que en *P. lethostigma* la cavidad ovárica se puede observar cuando los organismos miden entre 75 y 100 mm de longitud total (Luckenbach, 2003). En *P. californicus*, la aparición de la cavidad ovárica pudo observarse a los 158DDE, que corresponde a organismos de una longitud entre 72 y 104 mm. La aparición de la cavidad ovárica en *P. californicus*, se asemeja al desarrollo de *P. lethostigma*.

Algunos peces poseen ovocitos primarios en etapa perinuclear temprana, pero carecen de una cavidad ovárica; por el contrario, en otros casos la formación de la cavidad ovárica se forma mientras la división meiótica está muy avanzada. En *P. lethostigma* los organismos más pequeños con ovocitos primarios en la etapa de nucléolo cromatina y en la etapa perinuclear temprana, tuvieron longitudes de 115 mm, mientras que otros que exhibieron esas mismas

características, tuvieron una longitud mayor a 150 mm (Luckenbach *et al.*, 2003). En *P. californicus* el organismo más pequeño con ovocitos primarios tuvo una longitud de 127 mm, y los demás organismos tuvieron longitudes entre 134 y 164 mm, por lo que tiene una similitud en cuanto a las características morfológicas que presenta *P. lethostigma*.

Las células germinales primordiales en el primordio gonadal del lenguado de California se caracterizan porque tienen un solo nucléolo que permanece visible durante las primeras etapas de la gonadogénesis en todas las células germinales, hasta los 97 DDE (47 a 61 mm), cuando los nucléolos fueron menos evidentes, esto sugiere que se aproxima la división mitótica. Posteriormente, a la edad de 255 DDE (104 a 193 mm), se observaron ovocitos previtelogénicos con un núcleo redondo y nucléolo grande, y con un número reducido de pequeños nucléolos periféricos. La presencia de 2 a 3 nucléolos periféricos por ovocito indica que éstos se están preparando para proveer el gran número de ribosomas necesario para la síntesis de proteínas, y por lo tanto, estar preparados para el inicio de la meiosis.

Conclusiones y Recomendaciones

Cuando *P.californicus* se expuso al estradiol a una temperatura del agua de 20.6 ± 0.064 °C, a los 104 DDE solo se pudieron identificar organismos con gónadas indiferenciadas; por lo tanto, no pudieron identificarse hembras o machos. Por el contrario, organismos cultivados a una temperatura de 16.1 ± 0.31 °C pero sin esteroides, resultaron en una proporción sexual del 16% de hembras y 84% de machos.

Es posible que en *P. californicus*, se pueda inducir el desarrollo de hembras aplicando esteroides alrededor del día 29 DDE hasta el día 158DDE, a 16°C.

El experimento con esteroides sexuales no aportó información que permitiera identificar el periodo lábil para la diferenciación sexual. Sin embargo, en el experimento sin esteroides pudieron diferenciarse los ovarios y testículos. Por lo que se puede postular que el periodo lábil está entre el día 29 y 158 después de la eclosión, que corresponde entre los 8 y 104 mm de longitud total.

La aparición de la cavidad ovárica pudo observarse a los 158DDE, que corresponde a organismos cuya longitud se encuentra entre 72 y 104 mm.

Se recomienda hacer algunas mejoras en cuanto al protocolo que se utilizó para la administración del estradiol:

1. Implementar en los tanques un prototipo de jaula, donde se coloquen las larvas; esto para facilitar la limpieza y evitar un estrés excesivo en los organismos.
2. Evaluar nuevamente la concentración de 17β estradiol administrada durante el bioensayo, tomando en cuenta concentraciones más bajas durante periodos largos o concentraciones altas durante periodos cortos pueden inducir hembras de forma positiva.

Referencia Bibliográfica

Allen, L.G. 1988. Recruitment, distribution and feeding habits of young-of-the year California halibut (*Paralichthys californicus*) in the vicinity of Alamitos Bay- Long Beach Harbor, California. pp. 1983-1985. Bulletin South California Academic Science. 87,19-30.

Allen, L.G., Jensen, R.E., Sears J.R. 1990. Open coast settlement and distribution of young-of-the-year California halibut (*Paralichthys californicus*) along the southern California coast between Point Conception and San Mateo Point, June – October, 1988. En: C.W. Haugen, (Ed). The California halibut, *Paralichthys californicus*, resource and fisheries. Calif. Dept. Fish and Game, Fish Bulletin. 174.

Angus, R.A, Schultz, R.J. 1979. Clonal diversity in the unisexual fish *Poeciliopsis monacha-lucida*: A tissue graft analysis. Evolution. 33, 27 – 40.

Babin, P.J., Cerdà, J., Lubzens, E. 2007. The Fish Oocyte: From basic studies to biotechnological applications. Holanda. Springer. pp. 513.

Berdegue, J. 1956. Peces de importancia comercial en la costa nor-occidental de México. Secretaria de Marina, Dirección General de Pesca e Industrias Conexas. México.

Blazquez, M., Somoza, G.M. 2010. Fish with thermolabile sex (TSD) as models to study sex differentiation. General and comparative endocrinology. 166, 470-477.

Boschung, H. T. 1983. The Audubon Society Field Guide to North American fishes, whales, and dolphins. E.U.A. Random House. pp. 742 - 743.

Brandan, N.C., Llanos, I.C., Miño., C.A., Ragazzoli, M.A., Ruiz Díaz, D.A.N. 2008. Hormonas esteroides adrenales. Universidad Nacional del Nordeste. España. Recuperada de: <http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica>

Campuzano Hernández, A.C. 2010. Función de un sistema estuarino para subadultos y adultos del lenguado de California *Paralichthys californicus*. (Tesis de Maestría) Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, México.

Colombo, G., Grandi G. 1996. Histological study of the development and sex differentiation of the gonad in the European eel. Journal of Fish Biology. 48, 493-512.

Devlin, R.H., Nagahama, Y. 2002. Sex determination and differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*. 208, 191-364.

Estrada Flores E., Uribe Aranzábal M.del C. 2002. Atlas de histología de vertebrados. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. pp.199.

Extavour, C.G., Akam, M. 2003. Mechanisms of germ cells specification across the metazoans: epigenesis and preformation. *Development*. 130, 5869-5884.

Fushimi, S., Wada, N., Nohno, T., Tomita, M., Saijoh, K., Sunami, S., Katsuyama, H. 2009. 17β – Estradiol inhibits chondrogenesis in the skull development of zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*. 95, 292-298.

Gadomsky, D.M., Cadell, S.M., Abbott, L.R., Caro T.C. 1990. Growth and development of larval and juvenile California halibut, *Paralichthys californicus*, reared in the laboratory. pp. 85-98. En: C.W. Haugen. The California halibut, *Paralichthys californicus*, resource and fisheries. Calif. Dept. Fish and Game, Fish Bulletin. 174.

Gil Cano, F., Ayala Florenciano, M.D., López Albors O. S.F. Gónadas, vejiga natatoria y riñones de los peces. Anatomía Veterinaria. Murcia. Recuperada de: <http://www.um.es/anatvet/Documentos/Curso-Peces/pdfs/Gonadas-peces.pdf>

Gilbert, S.F. 2006. Biología del desarrollo. 7ª edición. Buenos Aires. Médica Panamericana. pp. 585 - 607.

Guigen, Y., Fostier, A., Piferrer, F., Chang, C.F. 2010. Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *General and comparative endocrinology*. 165, 352-366.

Haugen, C.H. Hammann, M.G. y Ramírez- Gonzalez A.A. 1990. California Halibut, *Paralichthys californicus*, in Todos Santos Bay, Baja California, México. En: C.W. Haugen. The California halibut, *Paralichthys californicus*, resource and fisheries. Calif. Dept. Fish and Game, Fish Bulletin. 174.

Herpin, A., Rohr, S., Riedel, D., Kluever, N., Raz, E., Shartl, M. 2007. Specification of primordial germ cells in medaka (*Oryzias latipes*). *BMC Developmental Biology*. 7, 1-10.

Hobbs, R.C., Botsford, L.W., Kope, R.G. 1990. Bioeconomic evaluation of the culture/stocking concept for California Halibut. pp. 417 – 449. En: Haugen, C.W. The California Halibut, *Paralichthys californicus*, resource and fisheries. Calif. Dept. Fish and Game, Fish Bulletin. 174.

- Ish, T., Stroman, F. 2006. California Halibut, *Paralichthys californicus*. Sustainable Fishery Advocates. Seafood Report: Final Report. pp. 28.
- Karp, Gerald. 2006. Biología celular y molecular. 4a edición. Mc Graw Hill Interamericana. México. pp. 746.
- Kiernan, J.A. 1999. Histological & Histochemical Methods. Third Edition. Butterworth Heinemann, Ontario. pp. 502.
- Kitano, T., Froschauer, A., Kobayashi, T., Nagahama, Y., Abe, S. 1999. Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Journal of Molecular Endocrinology. 23, 167-176.
- Koen Braat, A., Zandbergen, T., Van de Water, S., TH Goos, H.J., Zivkovic, D. 1999. Characterization of zebrafish primordial germ cells: morphology and early distribution of *vasa* RNA. Developmental dynamics. 216, 153-167.
- Kramer, S.H. 1990. Distribution and abundance of juvenile California halibut in shallow waters of San Diego County. pp. 99-126. En: C.W. Haugen. The California halibut, *Paralichthys californicus*, resource and fisheries. Calif. Dept. Fish and Game, Fish Bulletin. 174.
- Kuccas, S.T., Hassler, T.J. 1986. Species Profiles: Life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Pacific Southwest). California halibut. U.S. Fish and Wildlife Service. U.S. Army Corps of Engineers. Biological Report. 82, 11-44.
- Lodish, H., Berk, A., Lawrence, Z.S., Matsudaira, P., Baltimore D., Darnell, J. 2002. 2005. Biología celular y molecular. 5a edición. Madrid. Médica Panamericana. pp. 849-904.
- Luckanbach, J.A., Godwin, J., Daniels, H.V., Borsky R.J. 2003. Gonadal differentiation and effects of temperature on sex determination in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). Aquaculture. 216, 315-327.
- Lucknebach J.A. 2004. Breeding biotechnology, sex determination, and growth in southern flounder, *Paralichthys lethostigma*. (Tesis de Doctorado, North Carolina State University at Raleigh. U.S.A.) Recuperada de: <http://repository.lib.ncsu.edu/ir/bitstream/1840.16/3095/1/etd.pdf>

Luckenbach, J.A., Borski R.J., Daniels, H.V, Godwin J. 2009. Sex determination in flatfishes: Mechanisms and environmental influences. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 20, 256-263.

Luna, L.G. 1968. Manual of histological staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Third edition. U.S.A. Mc Graw-Hill. pp. 258.

Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerdà J. 2010. Oogenesis in teleost: how fish are formed. *General and comparative endocrinology*. 165, 367-389.

Márquez-Reyez, L. 2009. Efecto de la temperatura sobre la diferenciación sexual del lenguado de California, *Paralichthys californicus* (AYRES, 1859). (Tesis de Maestría) Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, México.

McMillan, D.B. 2007. Fish Histology, Female reproductive system. Canada. Springer. pp. 602.

Miller, D., Lea, R. 1972. Guide to coastal marine fish of California. Department of fish and game. Fish Bulletin. 157. pp. 235.

Moksness, E., Kjørsvik, E., Olsen Y. 2004. Culture of cold-water marine fish. UK. Blackwell. pp. 528.

Nagahama, Y. 1983. The functional morphology of teleost gonads pp. 223. En: Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. Fish Physiology. Vol. 9a. Academic Press.

Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X.T., Nagahama, Y. 1998. Gonadal sex differentiation in teleost fish. *The Journal of Experimental Zoology*. 281, 362-372.

Nakamura, A., Shirae – Kurabayashi, M., Hanyu – Nakamura, K. 2010. Repression of early zygotic transcription in the germline. *Current Opinión in Cell Biology*. 22, 709-714.

Navarro- Mendoza, M. 1985. Ecología trófica de la comunidad íctica en el estero de Punta Banda, Ensenada, B.C., México. (Tesis de Maestría) Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. División de Oceanología. Ensenada, México.

Nelson, J.S. 1994. Fishes of the World. Wiley. New York. pp. 600.

Ospina- Álvarez, N., Piferrer, F. 2008. Temperature – dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible

effects of climate change. PLoS ONE 3 (7): e2837. doi:10.1371/journal.pone.0002837

Pandian, T.J., Sheela, S.G. 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture*. 138, 1-22.

Piferrer, F., Donaldson, E. 1989. Gonadal differentiation in Coho Salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. *Aquaculture*. 77, 251-262.

Piferrer, F. 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*. 197, 229-281.

Piferrer, F. 2009. Determinación y diferenciación sexual en los peces. En: Carrillo, Estéves, M.A. La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura. Madrid. Fundación Observatorio Español de Acuicultura. pp. 249 – 336.

Presslauer, C., Nagasawa, K., Fernandes, J.M.O. y Babiak, I. 2012. Expression of *vasa* and *nanos3* during primordial germ cell formation and migration in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Theriogenology*. 78, 1262-1277.

Specker, J.L., Chandler, M.K. 2003. Methodology for estradiol treatment in marine larval and juvenile fish: uptake and clearance in summer flounder. *Aquaculture*. 217, 663-672.

Strüssmann, C.A, Takashima, F., Toda, K. 1996. Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture*. 139, 31-45.

Timmons, M.B., Ebeling, J.M. 2010. *Recirculating Aquaculture*. 2nd edition. NRAC Publication. pp. 948.

Turner, P.M. 2008. Effects of light intensity and tank background color on sex determination in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). (Tesis de Maestría. North Carolina State University, Raleigh, NC, USA.) Recuperada de: <http://repository.lib.ncsu.edu/ir/bitstream/1840.16/1482/1/etd.pdf>

Wang, H., Gao, Z., Beres, B., Ottobre, J., Wallat, G., Tiu, L., Rapp, D., O'Bryant, P., Yao, H. 2008. Effects of estradiol - 17 β on survival, growth performance, sex reversal and gonadal structure of bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*. *Aquaculture*. 285, 216-223.

Wertz, S.P., Kramer, S.H., Sunada, J.S. 2004. Annual status of the fisheries report through 2003, California Department of Fish and Game: Marine region: 14.1-14.11.

Yamamoto, E. 1999. Studies on sex – manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture*. 173, 235-246.

Zacarías – Soto, M., Muget, J.B. y Lazo, J.P. 2006. Proteolytic activity in California Halibut Larvae (*Paralichthys californicus*). *Journal of the World Aquaculture Society*. 37 (2), 175-185.

Apéndice 1. Preparación de la solución fijadora Davidson

Para preparar 1 litro de solución:

Glicerina	100 ml
Formaldehído 37%	200 ml
Etanol 96%	300 ml
Agua de mar filtrada	300 ml
Ácido Acético	100 ml

Agitar antes de usarse.

Apéndice 2. Técnica de deshidratación

Etanol 70%	1 hora
Etanol 96% - I	2 horas
Etanol 96% - II	2 horas
Etanol 100% - I	2 horas
Etanol 100% - II	2 horas
Etanol 100% - Benceno	3 horas
Benceno I	2 horas
Benceno II	2 horas
Benceno – Parafina	3 horas
Parafina I	2 horas
Parafina II	2 horas

Total 23 horas

Incluir en parafina.

Apéndice 3. Técnica de tinción de Hematoxilina – Eosina/Floxina

Esta técnica permite demostrar claramente un gran número de estructuras tisulares diferentes.

La Hematoxilina principalmente tiñe al núcleo de la célula con detalle intranuclear de color azul a negro; por otro lado, la Eosina tiñe el citoplasma celular y a gran parte de las fibras del tejido conectivo en diferentes intensidades de rosa, naranja y rojo.

Desparafinación e Hidratación:

Xileno I	5 min.
Xileno II	5 min.
Etanol 100% - I	1 min.
Etanol 100% - II	1 min.
Etanol 96%	1 min.
Etanol 50%	1 min.
Etanol 10%	1 min.
Agua destilada	Máximo 1 día

Tinción Hematoxilina – Eosina/Floxina.

Desparafinar las muestras hasta hidratar en agua.

Hematoxilina	4 min.
Agua corriente	Lavar.
Etanol ácido	30 sumergidas
Agua corriente	Lavar.
Carbonato de litio	1 – 2 min.
Agua corriente	Lavar.
Agua destilada	Lavar.
Etanol 96%	1 min.
Eosina/Floxiina	40 seg.
Etanol 96% - I	1 min.
Etanol 96% - II	1 min.
Etanol 100% - Xileno	3 min.
Xileno I	5 -10 min.