

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



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

**Efecto de la temperatura en la proporción de sexos de
*Totoaba macdonaldi***

Tesis

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

Presenta:

Rosa Cabrera Lozano

Ensenada, Baja California, México

2019

Tesis defendida por

Rosa Cabrera Lozano

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Benjamín Barón Sevilla

Director de tesis

Dra. Bertha Eugenia Lavaniegos Espejo

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez



Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz

Coordinadora del Posgrado en Acuicultura

Dra. Rufina Hernández Martínez

Directora de Estudios de Posgrado

Rosa Cabrera Lozano © 2019

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

Resumen de la tesis que presenta **Rosa Cabrera Lozano** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura

Efecto de la temperatura en la proporción de sexos de *Totoaba macdonaldi*

Resumen aprobado por:

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Director de tesis

La *Totoaba macdonaldi* es una especie de pez endémica del Golfo de California, catalogada en peligro de extinción y protegida por la legislación mexicana. La información biológica disponible la ubica como una especie con gran potencial acuícola, por lo que en la última década se han hecho importantes esfuerzos para desarrollar su cultivo. En diferentes especies de peces de importancia acuícola, como el lenguado japonés y la lubina europea, se ha observado una marcada diferencia en el crecimiento entre hembras y machos. También se sabe que en estas especies, la determinación sexual depende de la temperatura. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la exposición a diferentes temperaturas sobre la proporción sexual de *Totoaba macdonaldi*. Las totoabas se expusieron a las temperaturas de 18, 22, 26 y 30°C de los 24 a los 120 días después de la eclosión (DDE). Para identificar el sexo, las gónadas se analizaron mediante técnicas histológicas y se midieron los niveles de estradiol y testosterona en sangre. Adicionalmente se describió la gonadogenesis en hembras y machos tomando como referencia la longitud total (LT) de los organismos. No se encontró influencia de la temperatura sobre la diferenciación sexual, por lo que no se puede considerar que el sistema de determinación sexual de la totoaba es dependiente de la temperatura. Entre hembras y machos de 213 DDE de diferentes longitudes no se encontraron diferencias significativas en los niveles de estradiol y testosterona en sangre. En cuanto a la génesis gonadal se observó que los organismos menores a 6 cm (LT) se encontraban indiferenciados; entre los 6 y 10.5 cm (LT) ya presentaban cavidad ovárica en formación o totalmente formada y que la diferenciación de los machos ocurre cuando alcanzan una longitud igual o mayor a 15 cm. Además, se observó que durante el proceso de diferenciación gonadal, el arreglo histológico de las células somáticas y germinales difiere entre ovarios y testículos. En las hembras el tejido germinal (ovogonias) está ubicado en la parte central de la gónada, alrededor de la cavidad ovárica y en los machos, las espermatogonias están ubicadas en la periferia de la gónada. Al término del periodo de cultivo de 213 DDE no se observaron diferencias de crecimiento entre hembras y machos.

Palabras clave: Determinación sexual, diferenciación sexual, *Totoaba macdonaldi*, temperatura, esteroides, génesis gonadal

Abstract of the thesis presented by student **Rosa Cabrera Lozano** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture

Effect of temperature on the sex ratio of *Totoaba macdonaldi*

Abstract approved by:

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Thesis Director

The *Totoaba macdonaldi* is an endemic species of the Gulf of California listed as endangered and protected by Mexican law. The available biological information indicates that totoaba has great aquaculture potential. Therefore, in the last decade important efforts have been made to develop its cultivation. In different species of fish of aquaculture importance, such as the Japanese sole and European sea bass, a marked difference in the growth between females and males has been observed. It is also known that in these species, sexual determination depends on temperature. Thus, the objective of this work was to evaluate the effect of exposing *Totoaba macdonaldi* larvae at different temperatures on sexual proportion. The totoabas were exposed at 18, 22, 26 and 30 ° C from 24 to 120 days after hatch (DAH). To identify sex, the gonads were analyzed by histological techniques and the levels of estradiol and testosterone in the blood were measured. Additionally, gonadogenesis was described in females and males, taking as reference the total length (LT) of the organisms. No influence of temperature was found on sexual differentiation. Consequently, it cannot be considered that totoaba sexual determination system is temperature dependent. No significant differences were found in blood estradiol and testosterone levels between females and males of 213 DAH or different lengths. Regarding gonadal genesis, it was observed that organisms smaller than 6 cm (LT) were undifferentiated. Organisms between 6 and 10.5 cm (LT) already had ovarian cavity in formation or fully formed. Differentiation of the males occurs when they reach a length equal to or greater than 15 cm. In addition, it was observed that during the gonadal differentiation process, the histological arrangement of somatic and germ cells differs between ovaries and testicles. In females, the germ tissue (oogonia) is located in the central part of the gonad, around the ovarian cavity and in males, the spermatogonia are located at the periphery of the gonad. At the end of the cultivation period of 213 DAH no growth differences were observed between females and males.

Keywords: Sexual determination, sexual differentiation, *Totoaba macdonaldi*, temperature, steroids, gonadal genesis.

Dedicatoria

A Dios

A mis hijos “los pulgos”: Eduardo Itzae, Ricardo, Gloria Wendoline, Nathali Guadalupe, Ricardo Cuauhtlatoazin, Ricardo Emanuel, Camilo Yomar y Yetzali.

A mi Esposo: Eloy Eduardo

A mis padres: María y José

A mis hermanos: Ricardo, Yaya, Yoyis y Lucero

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), por haberme permitido el acceso a las instalaciones y el uso de los equipos requeridos para mi trabajo de tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada durante mis estudios de maestría.

Al Instituto de Acuicultura del estado de Sonora y al personal técnico del Centro Reproductor de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES), por la donación de huevos de *Totoaba macdonaldi* los cuales fueron esenciales para poder realizar el presente estudio.

Al Dr. Benjamín Barón Sevilla, por aceptarme como su alumna, por compartirme su conocimiento y experiencia en el cultivo de peces marinos.

A las Dras. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez y Bertha Eugenia Lavaniegos Espejo por aceptar ser parte de mi comité de tesis, por darse el tiempo de estar en mis avances de tesis, por sus observaciones y recomendaciones.

Al personal del departamento de Acuicultura: Bibiana, Dalila, Amparo, Carlos Campos, Adrián, Doña Lupe y Doña Mari, por siempre atenderme con una sonrisa.

Al técnico del departamento de acuicultura de CICESE Jesús Mariscal Medina por su apoyo en el cultivo larvario de *Totoaba macdonaldi*.

Al M. en C. Yanet Guerrero Rentería, técnico del Laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del Departamento de Acuicultura, por su apoyo en la capacitación, elaboración de laminillas histológicas, cotizaciones y estandarización de protocolos requeridos en mi investigación de tesis.

Al M en C. Abelardo Campos Espinoza por su apoyo con los análisis de estradiol y testosterona.

Al técnico del departamento de acuicultura de CICESE Luis Alberto Murillo Valenzuela por su apoyo en la instalación y reparación de los sistemas de cultivo.

Al personal académico del departamento de acuicultura por compartir sus conocimientos; especialmente a la Dra. Mónica Hernández Rodríguez y a la Dra. Beatriz Cordero Esquivel, por estar al tanto de mi trabajo de tesis, por sus comentarios y recomendaciones.

A Claudia y Magda por su apoyo durante mi trabajo de tesis.

A Francisco Javier Ponce Guerra por la digitalización del esquema de gónadas de *Totoaba macdonaldi*.

A los guardias del departamento de acuicultura, especialmente a Don Mario, Don Pedro y a Mayra por estar al pendiente de mi experimento y por su apoyo alimentando a los rotíferos por las noches.

A mis compañeros de clase Meli, Diamanda, Pato, Leo, especialmente a Doris, Eliasid y Gabriel por brindarme su amistad.

A todas las personas anteriormente mencionadas, gracias por hacerme los días agradables, a tal grado que parecía que en lugar de ir a trabajar a CICESE iba a divertirme.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xv
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	2
1.1.1 Sistemas sexuales en los peces teleósteos.....	2
1.1.2 Determinación sexual en peces gonocóricos	4
1.1.2.1 Determinación sexual genética.....	5
1.1.2.2 Determinación sexual ambiental.....	6
1.1.2.2.1 Determinación sexual por temperatura (TSD).....	6
1.1.2.2.1.1 Enzima citocromo P450 aromatasas.....	8
1.1.3 Esteroides sexuales en peces teleósteos.	9
1.1.3.1 Andrógenos.....	9
1.1.3.2 Estrógenos.....	10
1.1.3.3 Progestágenos	10
1.1.4 Diferenciación sexual	10
1.1.4.1 Morfología de los testículos.....	11
1.1.4.1.1 Diferenciación testicular.....	13
1.1.4.2 Morfología del ovario.....	14
1.1.4.2.1 Diferenciación ovárica.....	15
1.1.5 Biología de la <i>Totoaba macdonaldi</i>	16
1.2 Justificación	17
1.3 Hipótesis	18
1.4 Objetivos.....	18
1.4.1 Objetivo general	18
1.4.2 Objetivos específicos.....	19

Capítulo 2. Materiales y métodos	20
2.1 Cultivo larvario (0 a 23 días después de la eclosión (DDE)).....	20
2.2 Exposición a diferentes temperaturas (24 a 120 DDE).....	21
2.2.1 Tratamiento de temperatura.....	21
2.2.2 Monitoreo de parámetros físicos y químicos.....	23
2.2.3 Biometrías.....	23
2.2.4 Identificación del sexo.....	23
2.3 Identificación del sexo y análisis de estradiol y testosterona en sangres (121 al 213 DDE)	24
2.3.1 Mantenimiento de organismos.....	24
2.3.2 Mantenimiento y monitoreo de parámetros físicos y químicos.....	25
2.3.3 Biometrías.....	26
2.3.4 Análisis de estradiol y testosterona.....	26
2.3.5 Identificación de sexo.....	26
2.4 Medición de gonias y gonadogenesis.....	27
2.4.1 Determinación del diámetro de gonias.....	27
2.4.2 Gonadogenesis.....	27
2.5 Análisis de datos.....	27
 Capítulo 3. Resultados	 29
3.1 Exposición a diferentes temperaturas (24 a 120 DDE).....	29
3.1.1 Supervivencia.....	29
3.1.2 Longitud patrón y peso de <i>Totoaba macdonaldi</i> de 120 DDE expuesta a diferentes tratamientos de temperatura.....	29
3.1.3 Análisis de parámetros físicos, químicos y poblacionales.....	31
3.1.4 Características de las gónadas de los peces de 52, 72, 102 y 120 DDE expuestos a diferentes temperaturas.....	31
3.1.4.1 Características de las gónadas a los 52 DDE.....	31
3.1.4.2 Características de las gónadas a los 72 DDE.....	32
3.1.4.3 Características de las gónadas a los 102 DDE.....	34
3.1.4.4 Características de las gónadas a los 120 DDE.....	35
3.2 Identificación del sexo y análisis de estradiol y testosterona en sangre (121 a 213 DDE)..	36
3.2.1 Diferencias entre el ovario y el testículo en <i>Totoaba macdonaldi</i> a los 213 DDE.....	36
3.2.2 Porcentaje de hembras y machos.....	37
3.2.3 Longitud corporal y peso de la <i>Totoaba macdonaldi</i> a los 213 DDE.....	37
3.2.4 Características del ovario de totoaba a los 213 DDE	40

3.2.5 Características del testículo de totoaba los 213 DDE.....	42
3.2.6 Gonias en proceso de división celular.....	43
3.2.7 Anomalías encontradas en las gónadas.....	43
3.2.8 Análisis de estradiol y testosterona en sangre.....	45
3.3 Diámetro de gonias y génesis gonadal.....	47
3.3.1 Diámetro de células madre germinales.....	47
3.3.2 Génesis ovárica.....	47
3.3.3 Génesis testicular.....	50
Capítulo 4. Discusión.....	52
4.1 Exposición a diferentes temperaturas (18, 22, 26 y 30°C) durante el periodo de 24 a 120 DDE.....	52
4.1.1 Supervivencia.....	52
4.1.2 Crecimiento.....	54
4.1.3 Diferencias en el desarrollo de la gónada.....	55
4.2 Exposición de <i>Totoaba macdonaldi</i> a una temperatura común de los 120 a los 213 DDE.....	56
4.2.1 Proporción de sexos por tratamiento.....	56
4.2.2 Tamaño entre hembras y machos por tratamiento.....	58
4.2.3 Niveles de esteroides en sangre.....	60
4.2.4 Diámetro de gonias y génesis gonadal.....	62
4.2.4.1 Diámetro de gonias.....	62
4.2.4.2 Génesis gonadal.....	63
Capítulo 5. Conclusiones y recomendaciones.....	67
5.1 Conclusiones	67
5.2 Recomendaciones	68
Literatura citada.....	69
Anexos.....	76

Lista de figuras

Figura		Página
1	Sistemas de determinación sexual en peces gonocóricos.....	4
2	Aromatización de la testosterona y transformación a estradiol mediante la enzima P450 aromatasa (Tomado de Gallo et al., 2012).....	8
3	Corte trasversal de testículo lobulado de robalo común <i>Centropomus undecimalis</i> (Tomado de Uribe et al., 2014). Lo, Lóbulo; It, Tejido intersticial.....	12
4	Desarrollo de las espermatogonias y tipo de división entre cada etapa.....	14
5	Totoaba macdonaldi (Tomado de DNAT ecosistemas, 2019).....	17
6	Ubicación del CREMES y del CICESE. El CREMES está ubicado en Bahía Kino, Sonora a los 28°52'30.42"N y 112° 1'52.24"O y el CICESE se ubica en Ensenada, Baja California a los 31°52'9.46"N y 116°40'7.38"O.....	20
7	Diagrama del sistema de cultivo donde se mantuvieron los organismos a diferentes temperaturas (18, 22, 26 y 30°C). A, Vista frontal; B, Vista aérea (en esta imagen se omitió la línea de aireación para simplificación de la misma); TB, Tanque utilizado para poder realizar el efecto baño maría; TO, Tanque donde se colocaron a los organismos; TC, Tanque de compensación; BC, Bomba centrífuga; C/E, Calentador o enfriador de agua; A, Línea de aireación; AL, Línea de agua limpia; AC, Línea de agua caliente o fría (depende del tratamiento de temperatura utilizado).....	22
8	Disección histológica de <i>Totoaba macdonaldi</i> de acuerdo con su longitud total (LT). A, Zona de corte en peces menores de 2 cm de LT; B, Cavidad abdominal de peces mayores a 2 cm de LT de 52, 72 y 102 DDE (lugar donde se encuentran las gónadas, en la parte dorso lateral de la vejiga gaseosa); C, Disección ventral de <i>Totoaba macdonaldi</i> con 120 DDE, en donde se muestran las gónadas (GN) dispuestas a lo largo de la vejiga gaseosa. Línea punteada, zona donde se realizó el corte de los tejidos antes de ser incluidos en parafina.....	24
9	Diagrama del sistema de cultivo donde se mantuvieron los organismos de los 121 a los 213 DDE. T, Tanques (500 L); TS, Tanque de sedimentación; FM, Filtro mecánico; B, Biofiltro; BC, Bomba centrífuga; CA, Calentador de agua; AF, Línea de agua filtrada; ASF, Línea de agua sin filtrar; FE, Fraccionador de espuma; A, línea de aireación; D, Desagüe.....	25
10	Porcentaje de sobrevivencia de totoabas expuestas a diferentes tratamientos de temperatura. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (P=0.002). NOTA: El tratamiento de 30 °C no se incluyó en el análisis estadístico. La sobrevivencia en dicho tratamiento está representada por una sola réplica, ya que la mortalidad en las otras dos se debió a fallas mecánicas del sistema y no al tratamiento de temperatura.....	29

11	Longitud patrón (LP) de <i>Totoaba macdonaldi</i> a los 120 DDE expuesta a diferentes tratamientos de temperatura. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.001$). El tratamiento de 30 °C no se incluyó en el análisis estadístico debido a la muerte de los organismos de dos de las réplicas.....	30
12	Peso (W) de <i>Totoaba macdonaldi</i> a los 120 DDE expuesta a diferentes tratamientos de temperatura. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.001$). El tratamiento de 30 °C no se incluyó en el análisis estadístico debido a la muerte de los organismos de dos de las réplicas.....	30
13	Cortes transversales de gónada indiferenciada de <i>Totoaba macdonaldi</i> de 52 DDE expuestos a diferentes tratamientos de temperatura. A, 18 °C (LT= 1.9 cm); B, 22 °C (LT= 3 cm); C, 26°C (LT= 4.2 cm); D, 30 °C (LT= 5.1 cm); LT), Longitud total del organismo; GN, Gónadas; VG, Vejiga gaseosa; M, Mesenterio; G, gonias; N, Núcleo; UN, Nucléolo; C, Citoplasma; E, Eritrocito y VS, Vaso sanguíneo.....	32
14	Cortes transversales y longitudinales de gónada de <i>Totoaba macdonaldi</i> de 72 DDE expuestos a diferentes tratamientos de temperatura. A, 18°C (LT=4.1cm); B, 22°C (LT=7.5 cm); C 26°C (LT=10.4cm); D, 26°C (LT=8.4cm); E, 30 °C (LT=10.5 cm); F, 30 °C (LT=10.5 cm); LT, Longitud total del organismo; GN, Gónadas; VG, Vejiga gaseosa; H, Hígado; M, Mesenterio; MO, Mesovario; ELG, Elongación de la gónada; COF, Cavidad ovárica en formación; CO, Cavidad ovárica; G, gonias; N, Núcleo; UN, Nucléolo; C, Citoplasma; E, Eritrocito y VS, Vaso sanguíneo.....	33
15	Cortes transversales y longitudinales de gónada de <i>Totoaba macdonaldi</i> de 102 DDE expuestas a los diferentes tratamientos de temperatura. A, 18 °C (LT=5.6cm); B, 22 °C (LT=9cm); C, 26 °C (LT=13cm); D, 30 °C (LT=14cm); LT, Longitud total del organismo; M, Mesenterio; CO, Cavidad ovárica; OV, Ovogonia; TA, Túnica albugínea; ET, Estroma EG, Epitelio germinal; E, Eritrocito y VS, Vaso sanguíneo.....	34
16	Cortes transversales de gónada de <i>Totoaba macdonaldi</i> de 120 DDE expuestas al tratamiento de 18°C. A, Gónada indiferenciada (LT=6cm); B, Gónada con cavidad ovárica en formación (LT= 6cm) y C, Gónada con cavidad ovárica (LT=8cm) LT, Longitud total del organismo; M, Mesenterio; ME, Mesovario CO, Cavidad ovárica; COF, Cavidad ovárica en formación y ELG, Elongación de la gónada.....	35
17	Cortes longitudinales de gónadas de <i>Totoaba macdonaldi</i> de 120 DDE expuestas a diferentes tratamientos de temperatura. A, 22°C (LT=16 cm); B, 26°C (LT=15 cm) C, 30 °C (LT=16.8 cm); LT, Longitud total del organismo; CO, Cavidad ovárica; OV, Ovogonia; ESG, Espermatogonia; TA, Túnica albugínea; ET, Estroma EG, Epitelio germinal; E, Eritrocito y VS, Vaso sanguíneo.....	35
18	Ovarios y testículos de <i>Totoaba macdonaldi</i> de 213 DDE. A, Corte longitudinal de ovario (LT=23 cm); B, Corte transversal de ovario (LT=22cm); C, Corte longitudinal de testículo (LT= 27.5 cm); D, Corte transversal de testículo (LT= 25.5cm); LT, Longitud total del organismo; TA, Túnica albugínea; ET, Estroma; EP, Epitelio germinal; L, Lamelas ováricas y LO, Lóbulos.....	36

19	Porcentaje de machos y hembras de <i>Totoaba macdonaldi</i> expuestas a diferentes tratamientos de temperatura. Las barras grises representan el porcentaje de machos y las barras blancas el porcentaje de hembras. El número de organismos analizados fue diferente para cada tratamiento (18°C: n=48, 22°C: n=43, 26°C: n=46 y 30°C: n=46).....	37
20	Longitud patrón (LP) de <i>Totoaba macdonaldi</i> a los 213 DDE. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas (P=0.001). El tratamiento de 30°C no tiene letra sobre la barra debido a que este tratamiento no se incluyó en el análisis estadístico inferencial.....	38
21	Peso de <i>Totoaba macdonaldi</i> a los 213 DDE. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas (P<0.05). El tratamiento de 30°C no tiene letra sobre la barra debido a que este tratamiento no se incluyó en el análisis estadístico inferencial.....	38
22	Longitud patrón (LP) de hembras y machos de <i>Totoaba macdonaldi</i> a los 213 DDE expuestos a diferentes temperaturas. El tratamiento de 30°C no se incluyó en el análisis estadístico inferencial. M, Machos; H, Hembras, A, 18°C; B, 22°C; C, 26°C; D, 30°C.....	39
23	Peso de machos y hembras de <i>Totoaba macdonaldi</i> a los 213 DDE expuestos a diferentes temperaturas. A, 18°C; B, 22°C; C, 26°C; D, 30°C. Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticas. El tratamiento de 30°C no se incluyó en el análisis estadístico inferencial. M, Machos; H, Hembras.....	40
24	Cortes longitudinales de ovario de <i>Totoaba macdonaldi</i> de 213 DDE expuestos a diferentes tratamientos iniciales de temperatura. A, 18°C (LT=23.5cm); B, 22°C (LT=24.5cm); C, 26°C (LT=23cm) D, 26°C (LT=29cm); E, 30°C (LT=24.5); F, 30°C (LT=23.5 cm); LT, Longitud total del organismo; CO, Cavidad ovárica; OV, Ovogonia; TA, Túnica albugínea; ET, Estroma; EG, Epitelio germinal; L, Lamelas o crestas; F, Folículo; OP, Ovocito primario; N, Núcleo; UN, Nucléolo y C, Citoplasma.....	41
25	Cortes longitudinales de testículos de <i>Totoaba macdonaldi</i> de 213 DDE expuestos a diferentes tratamientos iniciales de temperatura. A 18 °C (LT=21 cm); B, 22°C (LT=20.5); C 26 °C (LT=26 cm); D, 30°C (LT=27.5 cm). LT, Longitud total del organismo; EG, Epitelio germinal; LO, Lóbulos; CIS, Cisto y EM, Espermatocito.....	42
26	Gonias de <i>Totoaba macdonaldi</i> en diferentes estados de división celular. A, Metafase (LT=20.8cm); B, Anafase temprana (LT=23cm); C, Anafase (LT=27.5cm); LT, Longitud total del organismo; OV, Ovogonia; CR, cromosoma; UN, Nucléolo; N, Núcleo y C, Citoplasma.....	43
27	Corte longitudinal de ovario de <i>Totoaba macdonaldi</i> de 213 DDE expuesta al tratamiento de 18°. A, y B, muestran fotomicrografías con diferente aumento de un organismo de LT=18 cm. LT, Longitud total del organismo; CO, Cavidad ovárica; OV, Ovogonia; TA, Túnica albugínea; ET, Estroma; EG, Epitelio germinal; L, Lamelas o crestas; F, Folículo; CIS, Cisto; y EM, Espermatocito.....	44

- 28 Cortes longitudinales de testículos de *Totoaba macdonaldi* de 213 DDE expuesta al tratamiento de 18°C. A, LT= 22 cm; B, LT= 26cm. LT, Longitud total del organismo; EG, Epitelio germinal; CA, Cavidad y CG, Células germinales..... 44
- 29 Niveles de testosterona en plasma de hembras y machos de *Totoaba macdonaldi* en diferentes tratamientos de temperatura. A, 18°C (P=0.285); B, 22°C (P=0.474); C, 26°C (P=0.282); D, Tratamiento de 30°C (P=0.443); M, Machos y H, Hembras. Barras negras, machos; Barras blancas, hembras. NOTA: para el análisis de los niveles de estradiol en el plasma se tomó como unidad experimental a cada organismo..... 45
- 30 Niveles de estradiol en plasma de hembras y machos de *Totoaba macdonaldi* en diferentes tratamientos de temperatura. A, 18°C (P=0.855); B, 22°C (P=0.425); C, 26°C (P=0.477); D, 30°C (P=0.673); M, Machos; H, Hembras. NOTA: para el análisis de los niveles de estradiol en el plasma se tomó como unidad experimental a cada organismo..... 46
- 31 Corte transversal de la cavidad abdominal de *Totoaba macdonaldi*. AD, Área dorsal del organismo; AV, Área ventral del organismo; VG, Vejiga gaseosa; GN, Gónada; H, Hígado; EST, Estomago; IN, Intestino..... 48
- 32 Génesis del ovario de *Totoaba macdonaldi*. A, Corte transversal del organismo (LT=1.9 cm); B, Corte trasversal de gónada (LT=4.1cm); C, Corte trasversal de gónada (LT=6.7cm); D, Corte transversal de gónada (LT=6cm); E, Corte transversal de ovario (LT=10.5 cm); F, Corte transversal del ovario (10.4 cm); G, Corte longitudinal del ovario (LT=13cm); H, Corte longitudinal del ovario (LT=14cm); I, Corte longitudinal del ovario (LT=23.5cm); J, Corte longitudinal del ovario (LT=18cm); K, Corte longitudinal del ovario (LT=27cm); L, Corte longitudinal del ovario (LT=28cm); LT, Longitud total del organismo; CO, Cavidad ovárica; OV, Ovogonia; TA, Túnica albugínea; ET, Estroma; EG, Epitelio germinal; L, Lamelas o crestas ováricas; F, Folículo; OP, Ovocito primario; VG, Vejiga gaseosa; GN, Gónada; H, Hígado; ELG, Elongación de la gónada y VS, Vaso sanguíneo..... 49
- 33 Génesis testicular de *Totoaba macdonaldi*. A, Corte transversal de totoaba (LT=1.9 cm); B): Corte transversal de la gónada (LT=4.1cm); C y C.1, Corte longitudinal de la gónada (LT=8.4cm); D y D.1, Corte longitudinal de la gónada (LT=15cm); E, Corte longitudinal de la gónada (LT=15cm); F, Corte longitudinal de la gónada (LT=21cm); G, Corte longitudinal de la gónada (LT=23.5 cm); I, Corte longitudinal de la gónada (LT=27.5 cm); J, Corte longitudinal de la gónada (LT=29cm); LT, Longitud total del organismo; GN, Gónada; VG, Vejiga gaseosa; M, Mesenterio; VS, Vaso sanguíneo; EG, Epitelio germinal; LO, Lóbulo; CIS, Cisto; CA, Cavidad y ESG, Espermatogonia..... 51
- 34 Modelo hipotético de la diferenciación del ovario y testículo de *Totoaba macdonaldi* (secciones transversales de las gónadas) elaborado a partir de cortes histológicos de ejemplares de diferentes edades y longitudes resumidos en las figuras 32 y 33. A, Gónada indiferenciada (figura 32-B, LT= 4.1 cm); B, Gónada con incisión de los futuros pliegues que darán origen a la cavidad ovárica (figura 32-C, LT=6.7 cm); C, Gónada con cavidad ovárica en formación (figura 32-E, LT=10.5 cm); D, Gónada con cavidad ovárica (figura 32-F, LT=10.4cm); E1, Ovario con proliferación de ovogonias solo en una parte central de la gónada (reconstrucción trasversal de la sección

- longitudinal de la figura 32-G LT=13 cm); F1, Ovario con proliferación de ovogonias en toda la parte central de la gónada y en toda la periferia de la cavidad ovárica (reconstrucción transversal de la sección longitudinal de la figura 32-H, LT=14 cm); G1, Ovario con lamelas ováricas pequeñas (reconstrucción de la sección longitudinal de la figura 32-I, LT= 23.5 cm); H1, Ovario con lamelas ováricas grandes (reconstrucción transversal de la sección longitudinal de la figura 32-K, LT=27 cm); I1, Ovario con folículos (reconstrucción transversal de la sección longitudinal de la figura 32-L, LT=28 cm); E2, Testículo con cavidad y gonias en la periferia y centro de la gónada (reconstrucción trasversal de la sección longitudinal de la figura 33-D.1, LT=15 cm); F2, Testículo con algunos lóbulos dispersos en la periferia de la gónada, cavidad y tejido germinal tanto en la periferia como en el centro de la gónada (reconstrucción transversal de la sección longitudinal de la figura 33-E, LT= 15 cm); G2, Testículo con lóbulos solo en una parte de la periferia de la gónada, cavidad y tejido germinal tanto en la periferia como hacia el centro de la gónada (reconstrucción transversal de la sección longitudinal de la figura 33-F LT=21 cm); H2, Testículo con lóbulos en toda la periferia de la gónada (reconstrucción transversal de la sección longitudinal de la figura 33-I, LT=27.5 cm); I2, Testículo con lóbulos en toda la periferia de la gónada y cistos con espermatoцитos (reconstrucción transversal de la sección longitudinal de la figura 33-J, LT=) 29cm ; GN, Gónada; M, Mesenterio; VS, Vaso sanguíneo; EG, Epitelio germinal; LO, Lóbulo; CIS, Cisto; CO, Cavidad ovárica; ESG, Espermatogonia; OV, Ovogonia; COF, Cavidad ovárica en formación; ELG, Elongación de la gónada; TA, Túnica albugínea; ET, Estroma; F, Folículo ovárico; L, lamelas o crestas ováricas y EM, Espermatoцитos..... 65
- 35 Longitud total de *Totoaba macdonadi* expuesta inicialmente a diferentes temperaturas y posteriormente a igual temperatura. Línea con guiones, 18°C; Línea punteada, 22°C; Línea continua, 26°C; Línea con punto y guion, 30°C..... 80

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Sistemas cromosómicos en peces Navara (2018) modificado por Cabrera-Lozano (2019).....	6
2	Parámetros físicos, químicos y biológicos en el cultivo de Totoaba macdonaldi expuesta a diferentes temperaturas a los 120 DDE.....	31
3	Reactivos utilizados en la preparación de 1 litro de solución Davidson's.....	76
4	Reactivos y tiempo de inmersión utilizados en la deshidratación de tejidos.....	77
5	Protocolo de desparafinado.....	78
6	Protocolo de tinción con hematoxilina-Eosina.....	79

Capítulo 1. Introducción

La totoaba, *Totoaba macdonaldi* es el pez más grande de la familia Sciaenidae, con una longitud máxima de 2.3 m y un peso de 150 kg (López y Coronel, 2016). Es endémica del Golfo de California y se distribuye desde la Bahía Concepción Baja California Sur hasta el río Fuerte en Sinaloa (Arvizu y Chávez, 1972). Debido a la disminución de las poblaciones naturales a causa de la sobreexplotación pesquera, fue declarada especie en peligro de extinción en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 y enlistada en el apéndice I de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) (SEMARNAT, 2018). A pesar de que la totoaba está declarada especie en peligro de extinción, se sigue capturando ilegalmente, debido al alto valor económico de la vejiga gaseosa (conocida como buche), que en el mercado asiático se cotiza alrededor de 60,000.00 USD por kilogramo (Infobae, 2017).

En la última década se han realizado estudios en totoaba con la finalidad de mejorar su cultivo (*com. pers.* Barón-Sevilla). Actualmente existen cultivos de totoaba en los estados de Sonora, Baja California y Baja California Sur. Algunos cultivos se realizan con fines de repoblamiento por las Unidades de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre (UMA), y otros con fines de comercialización por empresas de particulares.

En las poblaciones silvestres de totoaba se ha observado que las hembras son más grandes que los machos (Nakashima, 1916), por lo tanto, en los cultivos con fines comerciales, el realizar cultivos monosexo de hembras podría mejorar el rendimiento económico de esta actividad, ya que el periodo de mantenimiento de los organismos disminuiría y con ello todos los costos de producción. Algunos de los métodos utilizados para producir progenies de un solo sexo, son el suministro de esteroides y la exposición a ciertas temperaturas en especies con determinación sexual ambiental. Debido a que la temperatura es considerada un método de determinación sexual no contaminante en comparación con el uso de esteroides, que además están prohibidos en países desarrollados (Piferrer, 2009), en el presente trabajo se utilizaron diferentes tratamientos de temperatura con la finalidad de controlar la determinación sexual de la totoaba. Además, se estudiaron aspectos básicos de la biología reproductiva, como la génesis gonadal y los niveles de esteroides en plasma, a fin de proporcionar información biológica útil para mejorar el rendimiento económico de los cultivos de totoaba.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Sistemas sexuales en los peces teleósteos

Los peces teleósteos presentan tres tipos de sistemas sexuales: gonocorismo, hermafroditismo y unisexualidad. Entre el 80 y 98% de los peces conocidos se han clasificado como gonocóricos (Piferrer, 2009), es decir que una vez determinado su sexo, las gónadas se diferencian y funcionan como ovario o testículo durante toda su vida, por lo que solo se distinguen hembras y machos. Los peces gonocóricos se dividen en dos categorías principales: gonocóricos primarios cuyas gónadas se desarrollan desde un inicio como ovarios o como testículos, y en gonocóricos secundarios, organismos cuyas gónadas pasan por un estado de intersexualidad y posteriormente se desarrollan en un ovario o en un testículo (Lacadena, 1998; Pandian, 2012).

Dentro de la clasificación de peces gonocóricos primarios y gonocóricos secundarios existen dos subcategorías (Navara, 2018):

Gonocóricos primarios:

- a) Gonocóricos primarios cuya gónada se diferencia desde un inicio como ovario o como testículo.
- b) Gonocóricos primarios cuya gónada pasa por un estado indiferenciado que posteriormente se diferencia en un ovario o un testículo.

Gonocóricos secundarios:

- a) Gonocóricos secundarios cuya gónada se desarrolla en un pseudo-ovario y posteriormente se diferencia en un ovario o un testículo funcional.
- b) Gonocóricos secundarios cuya gónada se diferencia primeramente como un ovario, el cual puede madurar como ovario o puede transformarse en un testículo.

Otro tipo de sistema sexual en los peces es el hermafroditismo, entre el 1.5 y 2% de los peces a los que se les ha identificado el sexo son hermafroditas. (Piferrer, 2009). Los hermafroditas son organismos que tienen gónadas con tejidos masculino y femenino, y son capaces de producir gametos viables de ambas clases. Los espermatozoides y óvulos de los hermafroditas pueden producirse en gónadas separadas, es

decir en un testículo y en un ovario respectivamente, pero también ambos gametos pueden producirse en una sola gónada la cual se denomina ovotestis. (Lacadena, 1998).

Si los gametos se producen al mismo tiempo se les denomina hermafroditas simultáneos o sincrónicos, si la producción de espermatozoides u óvulos se da en tiempos diferentes se les conoce como hermafroditas secuenciales (Lacadena, 1998).

Los hermafroditas secuenciales se dividen en dos grupos: los hermafroditas protándricos y los hermafroditas protóginos, cada uno de estos tiene dos subdivisiones (Lacadena, 1998; Padian, 2011; Navara, 2018):

Hermafroditas protándricos:

- a) Monogínicas o de una vía de desarrollo: son organismos que primero se desarrollaron como macho y en la edad adulta se transforman en hembras.
- b) Digínicas o de dos vías de desarrollo: son hembras adultas que pueden desarrollarse a partir de dos orígenes: de machos adultos que se transforman en hembras o de hembras juveniles que maduran como hembras.

Hermafroditas protóginos

- a) Monándricos o de una vía de desarrollo: son organismos los cuales primero se desarrollan como hembras y en la etapa adulta estos se convierten en machos.
- b) Diándricos o de dos vías de desarrollo: son machos adultos que pueden desarrollarse a partir de dos orígenes de hembras adultas o de machos juveniles.

Existe un tercer tipo de hermafroditismo en los peces es el hermafroditismo serial, que consiste en el cambio de roles de sexo más de una vez en la vida, y puede ocurrir en sentido bidireccional ya sea de hembra a macho o viceversa. (Padian, 2011; Woottom y Smith, 2015)

Hay especies de peces en las cuales existe un solo sexo, en este caso hembras, y se les conoce como organismos unisexuales. Las hembras producen huevos haploides o diploides, los cuales requieren de los espermatozoides de machos de una especie simpátrica, para activar el desarrollo del óvulo, pero el

material genético del espermatozoide no participa en el proceso de fertilización. (Lagler et al., 1984; Piferrer, 2009; Pandian, 2010)

1.1.2 Determinación sexual en peces gonocóricos.

La determinación sexual es el proceso por el cual a un individuo se le asigna el sexo: hembra o macho (Piferrer, 2009). Los peces gonocóricos poseen todos los tipos de determinación sexual conocidos hasta el momento en los vertebrados (Figura 1) (Navara, 2018):

- a) Determinación sexual genética (por sus siglas en inglés: GSD)
- b) Determinación sexual ambiental (por sus siglas en inglés ESD)
- c) Determinación sexual genético-ambiental (es una combinación de la GSD y la ESD)

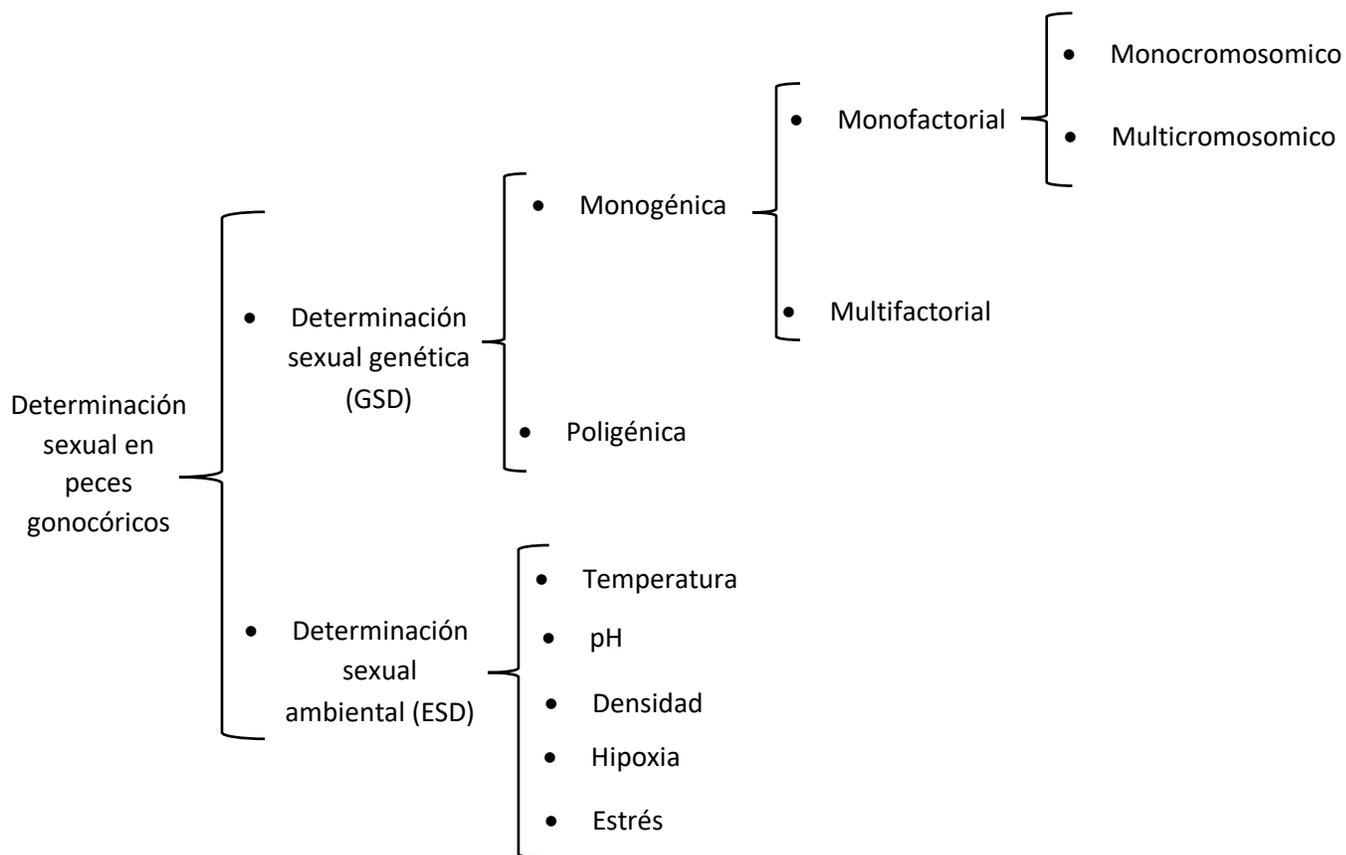


Figura 1. Sistemas de determinación sexual en peces gonocóricos

1.1.2.1 Determinación sexual genética

La GSD se presenta en la mayoría de los peces gonocóricos. El sexo es determinado en etapas muy tempranas del desarrollo justo después de la fertilización, durante la formación del cigoto, ya que el nuevo individuo puede recibir un cromosoma sexual del padre (cromosoma Y) o de la madre (cromosoma W). Solo en algunas especies se han identificado cromosomas sexuales heteromórficos, es decir que si existen diferencias en el tamaño y forma de los cromosomas sexuales entre las hembras y los machos. (Piferrer, 2009).

La GSD es monogénica cuando un solo gen es el que determina el sexo y dicho gen se encuentra en el cromosoma sexual (Navara, 2018), ejemplo de un gen determinante del sexo es el gen DMY el cual determina el sexo masculino en el pez medaka (Matsuda et al., 2002). En contraste, la determinación sexual genética poligénica consiste en que varios genes, ubicados en diferentes loci, son los que intervienen en la determinación del sexo, y se encuentran en uno o más autosomas (Navara, 2018).

La determinación sexual genética monogénica se clasifica en (Piferrer, 2009):

- a) Monofactorial: este sistema cromosómico sexual está compuesto por dos cromosomas (ejemplos: sistemas cromosómicos ZW y XY). Este sistema se divide en:
 - Monocromosómico: en este sistema un par de cromosomas determina el sexo del organismo (ejemplo XY= ♂ en la medaka común *Oryzias latipes*)
 - Multicromosómico: en este sistema más de dos cromosomas son los que determinan el sexo de organismo (ejemplo: $W_1W_2Z = ♀$ en el pez virolito *Apareidon affinis*)

- b) Multifactorial: este sistema está compuesto por tres o más cromosomas sexuales, pero solo un par de ellos son los que determinan el sexo de los organismos (ejemplo: sistema XYW donde las combinaciones XX, WX o WY dan origen a una hembra (♀), como ocurre en el pez platy *Xiphophorus maculatus*).

Aproximadamente del 6 al 11% de las especies estudiadas de peces poseen cromosomas sexuales, y se conocen 9 patrones cromosómicos, en cuatro de ellos el macho determina el sexo, en otros cuatro las hembras y en uno de ellos tanto la hembra como el macho puede determinar el sexo (Tabla 1) (Navara, 2018).

Tabla 1. Sistemas cromosómicos en peces (modificada de Navara, 2018).

Nombre del sistema	Hembra (♀)	Macho (♂)	Sexo determinante y su contribución
XY	XX	XY	Macho dona X o Y
X0	XX	X0	Macho dona X o no dona
$X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$	$X_1X_1X_2X_2$	X_1X_2Y	Macho dona X o Y
XX/XY_1Y_2	XX	XY_1Y_2	Macho dona X_1X_2 o Y
WZ	WZ	ZZ	Hembra dona W o Z
ZW_1W_2/ZZ	ZW_1W_2	ZZ	Hembra dona W_1W_2 o Z
Z0	Z0	ZZ	Hembra dona Z o no dona
YW/YY	YW	YY	Hembra dona W o Y
WXY	XX WY	XY YY	Hembras o machos pueden donar W y contrarrestar Y

1.1.2.2 Determinación sexual ambiental

Los organismos con ESD, no presentan diferencias genéticas entre los sexos, y por lo general la determinación del sexo puede ocurrir durante la embriogénesis, después de la eclosión en la etapa larvaria o en la etapa juvenil, dependiendo de la especie. Los factores ambientales de los cuales se tiene conocimiento que determinan el sexo son la temperatura, pH, fotoperiodo, salinidad, hipoxia y factores poblacionales como la densidad. Entre los más estudiados están la temperatura y el pH (Pandian, 2012; Piferrer, 2009).

1.1.2.2.1 Determinación sexual por temperatura (TSD)

Poseen TSD los organismos en los cuales la temperatura es capaz de modificar el sexo fenotípico de forma irreversible durante las etapas tempranas del desarrollo. Para que una especie se clasifique en la categoría de determinación sexual por temperatura, la temperatura que modifica el sexo tiene que estar dentro del intervalo natural de temperaturas de su hábitat. Si la temperatura que modifica el sexo de los individuos está fuera del intervalo natural, entonces se dice que tiene GSD con influencia ambiental (GSD+TD) (Piferrer, 2009).

Actualmente se conocen 40 especies de peces con TSD, de las cuales 33 son cíclidos sudamericanos de agua dulce del género *Apistogramma*. En la mayoría de las especies con TSD, la exposición a temperaturas elevadas durante el periodo lábil resulta en una mayor proporción de machos (Ospina-Álvarez y Piferrer, 2008). Algunos peces marinos con TSD como el pejerrey del Atlántico *Menidia menidia*, a temperaturas bajas (11 a 19°C) presenta mayor proporción de hembras, a temperaturas intermedias (20°C) hay proporciones equitativas entre hembras y machos y a temperaturas altas (17 a 25°C) hay mayor proporción de machos (Conover y Kinard, 1981); en el lenguado japonés *Paralichthys olivaceus* a temperaturas bajas (18°C) hay mayor proporción de hembras y a temperaturas altas (27°C) hay mayor proporción de machos (Kitano et al. 1999); y en la lubina europea *Dicentrarchus labrax* a temperaturas bajas (15°C) hay mayor proporción de hembras y a temperaturas altas (21°C) mayor proporción de machos (Blázquez et al. 2009).

No se conoce con certeza el o los mecanismos por los cuales la temperatura influye en la determinación del sexo de un individuo, sin embargo, se sabe que en cualquier sistema de determinación sexual, la proporción de andrógenos y estrógenos presentes en la gónada son los que provocan su diferenciación en un ovario o en un testículo. (Navara, 2018). La enzima encargada de mantener las proporciones de estas dos hormonas es la enzima aromatasa citocromo P-450 aromatasa, codificada por el gen *cyp19a1a*, cuya función es transformar los andrógenos de 19 carbonos (16-OH-androstendiona, androstendiona y testosterona) en estrógenos de 18 carbonos (estrone, estradiol y estriol) (Argemí et al., 1997).

El efecto de la temperatura en la determinación del sexo está asociado con la supresión de la expresión del gen *cyp19a1a* que codifica para la enzima citocromo P450 aromatasa (Guiguen et al., 2009; Kitano et al., 2000). Se cree que la temperatura probablemente pueda incidir sobre la hipermetilación de este gen a edades tempranas durante la determinación del sexo o que probablemente pueda inhibir la desmetilación a edades o tallas en las que ocurre la diferenciación de la gónada (Navarro-Martín et al., 2011).

Aparte del gen *CYP19a1*, se han encontrado otros genes determinantes del sexo como el *SOX9*, *AMH*, *DMRT1*, y *FOX-L2* cuya expresión varía dependiendo de la temperatura, tanto en las hembras como en los machos de peces. Sin embargo, el que la expresión de estos genes varíe entre sexos a diferentes temperaturas, no significa que dicha especie tenga TSD, ya que no se conoce si dichos genes inducen la determinación del sexo o si dicha variación es el resultado del cambio en el sexo (Navara, 2018).

1.1.2.2.1.1 Enzima citocromo P450 aromatasa

La enzima citocromo P450 aromatasa cataliza la síntesis de estrógenos: estrona y estradiol a partir de androstenediona y testosterona respectivamente. Es una proteína que está compuesta por un grupo hemo y una flavoproteína (Nicotinamida Adenina Dinucleotido Fosfato o NADPH) (BioCancer, 2019).

Los peces tienen dos isoformas de la aromatasa, la isoforma gonadal o A y la isoforma cerebral, neuronal o B, codificadas por los genes *cyp19a1a* y *cyp19a1b* respectivamente (Kishida y Callard, 2001). La primera isoforma es la que interviene en la diferenciación de las gónadas de los peces y se encuentra en el retículo endoplásmico de las células esteroideogénicas, especialmente en las células de la granulosa en el folículo ovárico en las hembras y en las células de Leydig en los machos (Piferrer, 2009).

La aromatasa recibe dicho nombre porque aromatiza el anillo A de la testosterona y la transforma a estradiol. El proceso de aromatización consiste en la eliminación de hidrógenos del anillo A y en consecuencia se introducen dobles ligaduras alternadas, que en química orgánica se conocen como anillo aromático (Figura 2) (Manzo, 2004; Calaf et al., 2009).

La aromatasa transforma la testosterona en estradiol en tres hidroxilaciones separadas, las dos primeras dan lugar a la 19-hidroxitestosterona y la 19-oxotestosterona. Durante estos procesos se consumen 2 NADPH+H y se desprenden dos moléculas de agua. En la última hidroxilación se cataliza la pérdida del metilo 19 con un desprendimiento del ácido fórmico (BioCancer, 2019).

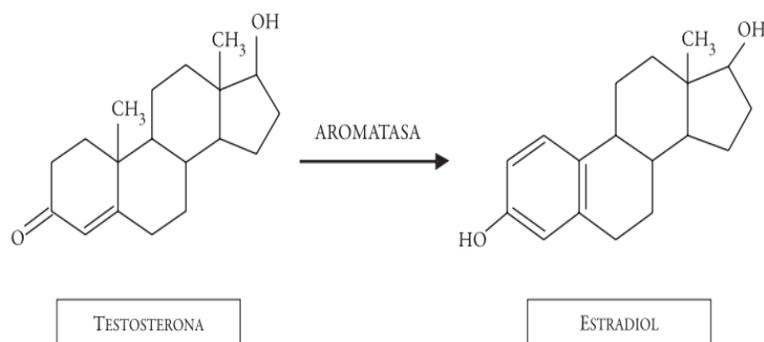


Figura 2. Aromatización de la testosterona y transformación a estradiol mediante la enzima P450 aromatasa (Tomado de Gallo et al., 2012)

1.1.3 Esteroides sexuales en peces teleósteos

Los esteroides son hormonas pequeñas derivadas del colesterol que intervienen en el desarrollo, en el mantenimiento de la homeostasis y en la reproducción. Se conocen como esteroides sexuales aquellos esteroides que intervienen en todos los procesos reproductivos de los vertebrados. En peces se conocen tres grupos principales de esteroides sexuales: los andrógenos, estrógenos y progestágenos (Piferrer, 2009; Young et al., 2005). Los esteroides sexuales tienen la función de dirigir el desarrollo de las células germinales, glándulas accesorias y órganos reproductivos, así como participar en la determinación y diferenciación sexual y modificar el comportamiento de los organismos para asegurar la reproducción.

Los esteroides sexuales son sintetizados en las células de la teca y de la granulosa del folículo ovárico de las hembras. En los machos se sintetizan en las células de Leydig de los testículos. En las células de la granulosa, teca y de Leydig se expresan los genes que producen las enzimas esteroidogénicas que transforman al colesterol y sus derivados. La expresión de estos genes varía dependiendo de la especie, sexo, edad y estado reproductivo del organismo (Young et al., 2005).

1.1.3.1 Andrógenos

Los principales andrógenos detectados en el plasma en machos de peces teleósteos son: la testosterona (T), 11 β -hidroxitestosterona (OHT) y la 11-cetotestosterona (11-KT), esta última es el andrógeno generalmente más abundante en los machos. Los andrógenos tienen funciones como la diferenciación gonadal, el desarrollo de las características sexuales secundarias, la regulación de la espermatogénesis y la activación del comportamiento sexual en los machos como la agresividad y la construcción de nidos (en especies que construyen nidos para el apareamiento y la incubación de los huevos) (Goncalves y Oliveira, 2011).

El andrógeno más abundante encontrado en el plasma de las hembras es la testosterona y sus concentraciones se relacionan con el comportamiento agresivo de las hembras en la protección y la construcción de nidos (Goncalves y Oliveira, 2011).

1.1.3.2 Estrógenos

Los estrógenos participan principalmente en la diferenciación y reproducción de las hembras especialmente en la etapa de vitelogenesis (Young et al., 2005). El estradiol es el estrógeno más abundante en las hembras y promueve la proliferación ogonial y la inducción de la síntesis de vitelogenina en los hepatocitos (Young et al., 2005; Goncalves y Oliveira, 2011).

En la reproducción de los machos los estrógenos, principalmente el estradiol, interviene al inicio de la espermatogénesis, en la proliferación de las espermatogonias (Young et al., 2005).

1.1.3.3 Progestágenos

Los principales progestágenos que intervienen en la reproducción de los machos son la progestina 17,20 β P, 17,20 β ,21-trihydroxy-4-pregen-3-one (17,20 β ,21P), y 17,20 α -dihydroxy-4-pregen-3-one (17,20 α P), las cuales modulan los comportamientos de exhibición en el cortejo e inducen la espermatogénesis y la espermiación (Young et al., 2005).

En las hembras los progestágenos (17,20 β ,21P), y 17,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (20 β -S) están involucrados en la inducción a la maduración final y a la ovulación (Young et al., 2005) y el 17,20 β ,21P funciona como atrayente estimulando al sistema olfativo de los machos en la época de reproducción (Goncalves y Oliveira, 2011).

1.1.4 Diferenciación sexual

La diferenciación sexual es el proceso por el cual una gónada indiferenciada se desarrolla en un ovario o en un testículo (Piferrer, 2009), y comienza poco después de que las células germinales primordiales (por sus siglas en inglés PGC) llegan al primordio gonadal (Paul-Prasanth et al., 2011). Las PGC son de origen extra embrionario y migran mediante movimientos ameboides, desde la periferia de la capa endodérmica y el periblasto. Pasan por el tracto digestivo, la placa lateral y el ectodermo, y posteriormente se introducen al mesodermo somático a través del mesenterio dorsal hasta que llegan y se alojan en el

primordio gonadal, donde son envueltas totalmente por tejido somático. (Hamaguchi, 1982; Kobayashi et al., 2004).

Las futuras gónadas se componen por dos linajes celulares: las células germinales primordiales (PGC) y por células somáticas que sirven de soporte a las PGC (Zanuy et al., 2009). Una vez que las PGC llegan al primordio gonadal son envueltas por las células somáticas y comienzan a desarrollarse las gónadas (Pandian, 2012).

1.1.4.1 Morfología de los testículos

Los testículos son los órganos reproductores masculinos. En la mayoría de los peces son pareados, a excepción de los mixinos y lampreas que poseen un solo testículo. Están ubicados longitudinalmente respecto al cuerpo de pez y se encuentran sostenidos por el mesorquio en la región dorsal de la cavidad abdominal del organismo, en los flancos derecho e izquierdo de la vejiga gaseosa. Poseen un ducto espermático que sale desde la parte media posterior de cada testículo hasta la papila urogenital, la cual en la mayoría de las especies se sitúa entre los conductos urinarios y el recto (Zanuy et al., 2009; Helfman, et al., 2009). En algunas especies en la etapa de maduración los testículos pueden representar hasta el 12% del peso corporal de los individuos, aunque por lo general la proporción es menor. (Helfman et al., 2009)

Entre los peces teleósteos existen dos tipos de testículos: el tubular y el lobular. Los testículos lobulares tienen una cavidad central, alrededor de ésta, están dispuestos en forma radial los lóbulos que se extienden hacia la periferia, se encuentran separados entre sí por una capa delgada de tejido conjuntivo fibroso, dentro de los lóbulos se encuentran distribuidas las espermatogonias las cuales darán origen a los espermatozoides (Callard, 1991). Los testículos tubulares están compuestos de túbulos ramificados que en la periferia se anastomosan entre sí (Parenti y Grier 2004).

La mayoría de los peces poseen testículos lobulares. Este tipo de testículo, dependiendo de donde se encuentren las células germinales y de si son huecos o no, se dividen en:

- a) Testículos lobulares restrictos: poseen lóbulos sólidos y las espermatogonias se encuentran solo en la parte más distal de los lóbulos, cerca de la túnica albugínea (la membrana que cubre

externamente al testículo), las espermatogonias se desarrollan hasta espermatozoides desplazándose progresivamente desde la periferia de la gónada hacia el centro (Patiño y Redding, 2000; Parenti y Grier, 2004).

- b) Testículos lobulares irrestrictos: Los lóbulos son huecos y las espermatogonias se encuentran distribuidas a lo largo de todo el lóbulo, donde forman cistos de espermatocitos que se desarrollan progresivamente hasta espermatozoides que se liberan al lumen del lóbulo (Patiño y Redding, 2000; Parenti y Grier, 2004).

Los testículos lobulares están compuestos por dos compartimentos, el intersticial y el lobular (Figura 3). El compartimento lobular está compuesto por las células germinales y las células de Sertoli que las rodean, la función de estas células somáticas es el mantenimiento y protección de las espermatogonias (Zanuy et al., 2009), las cuales tienen varias divisiones mitóticas y forman cistos o quistes, cuyas células rodean a las células germinales que se encuentran en el mismo grado de desarrollo (Pandey y Shukla, 2007). El número de espermatogonias que originan un cisto o un quiste puede variar de una a tres dependiendo de la especie y dan origen a un mayor número de espermatocitos primarios.

El compartimento intersticial comprende el espacio entre los lóbulos y la integran varios tipos celulares, como vasos sanguíneos, vasos linfáticos, fibroblastos y células de Leydig estas últimas son las encargadas de la producción de esteroides. (Zanuy et al., 2009).

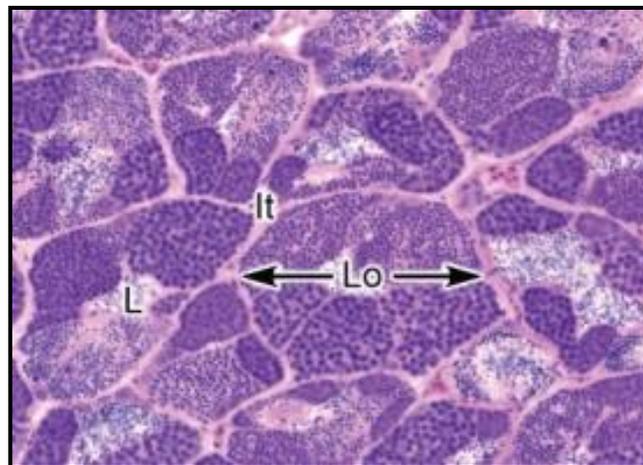


Figura 3. Corte trasversal de testículo lobulado de robalo común *Centropomus undecimalis* (Tomado de Uribe et al., 2014). Lo, Lóbulo; It, Tejido intersticial.

1.1.4.1.1 Diferenciación testicular

En la mayoría de los machos la diferenciación testicular y la proliferación de las PGC es posterior que la del ovario, por lo que una gónada que se diferenciará en un testículo permanecerá más tiempo indiferenciada que una gónada que se desarrollará en un ovario (Pandian, 2012; Hamaguchi, 1982).

En una gónada indiferenciada que se transformara en testículo, el primer evento histológico es la proliferación de las células de Sertoli (Paul-Prasanth et al., 2011) las cuales dirigen y organizan el desarrollo y la morfogénesis de los testículos (Brennan y Capel, 2004). Las células de Sertoli se originan a partir de células mesodérmicas que envuelven a las PGC, denominadas células pre-Sertoli (Kobayashi, et al., 2004).

Posterior a la proliferación de las células de Sertoli, comienza la proliferación de espermatogonias, las cuales se detienen en etapa de mitosis (Kobayashi, et al., 2004). A continuación se desarrolla una estructura globular o masa de células, que es el precursor de los tubos seminíferos en los testículos, estos forman una red compleja de canales que al final convergen en uno solo.

El nombre que recibe una célula germinal en el testículo depende del grado de desarrollo que tenga. La célula germinal madre o espermatogonia A se va a renovar por mitosis dando origen a otra espermatogonia primordial tipo A o a una espermatogonia secundaria o B. Las tipo A quedaran como reserva para seguir produciendo espermatogonias A o B durante toda la vida del organismo (Parenti, y Grier. 2004) mientras que las del tipo B, se transforman en espermatozoides mediante una serie de divisiones mitóticas y meióticas (Figura 4) (Pandey y Shukla, 2007). El número de divisiones mitóticas que realiza una espermatogonia antes de comenzar a dividirse por meiosis va a depender de la especie (Zanuy, et al., 2009).

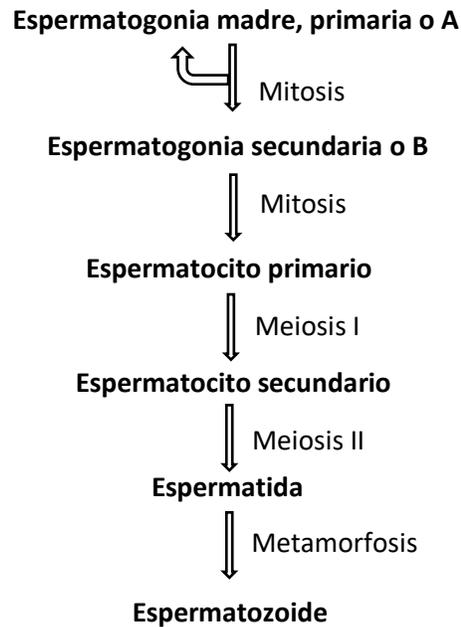


Figura 4. Desarrollo de las espermatogonias y tipo de división entre cada etapa.

1.1.4.2 Morfología del ovario

Los ovarios son los órganos reproductores femeninos, cuya función es la producción de óvulos, puede ser el lugar donde ocurre la fertilización, pueden almacenar espermatozoides y pueden ser el lugar donde se nutran y desarrollen los embriones (Zanuy et al., 2009; McMillan, 2007). Estas funciones varían según la especie. Los ovarios son órganos alargados, por lo general pareados, pero en varias especies están fusionados en un solo ovario. Están dispuestos internamente en la parte dorsal de la cavidad abdominal de los organismos, están sujetos por el mesovario a la pared ventral de la vejiga gaseosa. (Helfman, et al., 2009).

Los ovarios están compuestos por el epitelio germinal el cual forma lamelas durante su desarrollo, que son una extensión del epitelio germinal hacia el interior del ovario. El ovario también contiene a la túnica albugínea que es una capa densa de tejido conectivo, musculo liso y vasos sanguíneos. La túnica albugínea tiene una extensión denominada estroma ovárico, la cual está en contacto con el epitelio germinal y es el lugar donde se desarrollan los folículos. (Parenti, y Grier, 2004; Zanuy et al., 2009).

Dependiendo del ritmo de desarrollo de los ovocitos, se distinguen tres tipos de desarrollo ovárico:

- a) Desarrollo sincrónico: todos los ovocitos en el ovario tienen el mismo grado de desarrollo. Los organismos con este tipo de desarrollo desovan una sola vez al año o una sola vez en su vida.
- b) Desarrollo sincrónico por grupos: al menos existen dos grupos de ovocitos en diferente estado de desarrollo. Los organismos con este tipo de desarrollo pueden tener de una a cinco puestas durante la época reproductiva.
- c) Desarrollo asincrónico: el ovario se caracteriza por tener ovocitos en varios estados de desarrollo. Los organismos con desarrollo asincrónico se caracterizan por tener varias puestas durante todo el año. (Zanuy et al., 2009).

1.1.4.2.1 Diferenciación ovárica

La proliferación de las PGC inicia más tempranamente en una gónada indiferenciada que se desarrollará en ovario, que en una que se desarrollará como un testículo. Por este motivo el momento de la proliferación de las PGC en una gónada indiferenciada es el primer indicio de que una gónada se está desarrollando en un ovario. (Pandian, 2012; Hamaguchi, 1982; Kobayashi, et al., 2004). Después de la proliferación de células germinales se desarrolla la cavidad ovárica.

Una vez formada la cavidad ovárica aumenta la proliferación de las células germinales mediante la mitosis, ahora denominadas ovogonias. Después de varias rondas mitóticas las ovogonias se comienzan a dividir por meiosis lo que da origen a los ovocitos primarios. Estos se aíslan del epitelio germinal y pasan al estroma junto con una monocapa de células somáticas del epitelio, que se diferenciarán en células de la granulosa. Una vez en el estroma, el prefolículo (ovocito primario más células pregranulosa) es recubierto por una segunda monocapa de células de tejido conectivo denominadas células tecales o de la teca (Grier, 2000; Zanuy et al., 2009).

El ovocito primario envuelto por las células de la granulosa y de la teca, recibe el nombre de folículo. En su interior, el desarrollo del ovocito se detiene en la primera división meiótica, al final de la profase en estado de diploteno. El tiempo durante el cual el ovocito se detiene durante esta etapa, varía dependiendo de la especie. Durante esta parada meiótica, el folículo crece y acumula ARN y reservas nutricionales que

servirán para las etapas posteriores de la meiosis, para la fertilización y para el correcto desarrollo del embrión. (Parenti y Grier, 2004; Zanuy et al., 2009).

1.1.5 Biología de *Totoaba macdonaldi*

La Totoaba, *Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1890) es un pez perteneciente a la familia de las curvinas, y taxonómicamente se clasifica de la siguiente manera:

Reino: Animalia

Phylum: Chordata

Clase: Actinopterygii

Orden: Perciformes

Familia: Sciaenidae

Género: *Totoaba*

Es el pez más grande de la familia de los scianidos, la longitud y pesos máximos reportados son de 2.3 metros y 150 kg respectivamente, además son muy longevos, con una edad máxima de 50 años (Figura 5). Es un pez endémico del golfo de California, se reproduce en la región de la desembocadura del río Colorado durante los meses de febrero a junio (Nakashima, 1916; López y Coronel, 2016), pero la mayor actividad reproductiva se presenta entre los meses de marzo y abril (De Anda-Montañez et al., 2013). En la desembocadura del río Colorado durante la época reproductiva de la totoaba la temperatura oscila entre los 16 y 31°C (Ramírez-León et al., 2015).

La *Totoaba macdonaldi* es una especie gonocórica y la diferenciación sexual de las hembras ocurre alrededor de los 51 días después de la eclosión, cuando tienen una longitud total de 6.3 a 8 cm (Paredes, 2018). No presenta dimorfismo sexual externo, aunque en la edad adulta las hembras son más grandes que los machos y durante la etapa reproductiva las hembras se caracterizan por tener el abdomen abultado y los machos por emitir un sonido similar a un ronquido, por lo que se les denomina roncadores (*com. pers.* Barón-Sevilla, 2019). No se conoce con precisión la longitud y peso a los que la totoaba madura sexualmente, sin embargo, se han encontrado ejemplares maduros a longitudes totales de 121 cm y pesos de 14.5 kg. La edad en la que alcanzan su madurez sexual varía entre los cuatro y seis años (Arvizu y Chávez

1972; López y Coronel, 2016) aunque en condiciones de laboratorio se han conseguido machos y hembras sexualmente maduras a los tres años de edad (*com. pers.* Barón-Sevilla, 2018).



Figura 5. *Totoaba macdonaldi* (Tomado de DNAT ecosistemas, 2019).

1.2 Justificación

La *Totoaba macdonaldi* es una especie endémica del golfo de California que actualmente se encuentra declarada especie en peligro de extinción. El precio de la vejiga gaseosa (“buche”) de totoaba en el mercado ilegal llega hasta 60,000.00 USD por kilogramo (Infobae, 2017). Este costo elevado la hace susceptible a una captura clandestina e indiscriminada, lo que ha ocasionado una importante disminución de sus poblaciones. Como una medida de remediación contra la disminución de poblaciones naturales de totoaba, se han establecido Unidades de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre que tienen como objetivo realizar actividades de repoblamiento. A pesar de lo anterior, actualmente no se tiene información oficial sobre la recuperación de las poblaciones naturales, pero si se tienen datos de que la pesquería ilegal de totoaba continua. Ante esta situación, se ha optado por realizar cultivos de *T. macdonaldi* con fines comerciales, sin embargo, sobre la biología reproductiva de la especie existe poca información.

Uno de los objetivos principales de los cultivos comerciales es obtener la mayor ganancia económica posible. Una de las estrategias que se utilizan para lograr lo anterior es a través de cultivos monosexo en los cuales se selecciona el sexo que alcanza el mayor peso en el menor tiempo. En cuanto a *T. macdonaldi*, no se tienen registros del desarrollo de cultivos monosexo, razón por la cual, en el presente trabajo se evaluó el efecto de la temperatura en la determinación del sexo de la totoaba, para posteriormente utilizar a la temperatura como una alternativa para tener cultivos de organismos monosexados. Se midieron los niveles de estradiol y testosterona en el plasma de totoabas para poder identificar el sexo de los organismos. Además se describió la génesis gonadal, esto con la finalidad de generar información biológica que sirva de base para posteriores estudios donde se apliquen tratamientos de monosexado en esta especie.

1.3 Hipótesis

1).- La proporción sexual de la progenie de *Totoaba macdonaldi* está influenciada por la temperatura de cultivo: a una temperatura de 30 °C se favorece la diferenciación sexual de machos y a 18 °C la diferenciación sexual de hembras.

2).- El sexo de los juveniles de *Totoaba macdonaldi* de siete meses de edad se puede identificar mediante los niveles de estradiol y testosterona en la sangre.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto de la temperatura de cultivo (18, 22, 26 y 30 °C) en la proporción de sexos y describir el desarrollo gonadal en la *Totoaba macdonaldi*.

1.4.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la temperatura (18, 22, 26 y 30 °C) en el desarrollo larval y en la proporción de sexos de la progenie de *T. macdonaldi*
- Identificar el sexo de los juveniles de *T. macdonaldi* mediante métodos histológicos y niveles de estradiol y testosterona en la sangre
- Evaluar el crecimiento y la supervivencia en las etapas tempranas del desarrollo de *T. macdonaldi* a diferentes temperaturas (18, 22, 26 y 30 °C)
- Describir la ontogenia gonadal de la *T. macdonaldi* mediante métodos histológicos

Capítulo 2. Materiales y métodos

2.1 Cultivo larvario (0 a 23 días después de la eclosión (DDE))

Para el desarrollo de este estudio se recibió un lote de huevos de *Totoaba macdonaldi*, donados por el Centro Reproductor de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES) del Instituto de Acuicultura de Sonora. Los huevos fueron colocados en recipientes cúbicos de plástico con capacidad de 10 L a una densidad de 10,000 huevos por litro, con oxígeno puro a saturación y a una temperatura aproximada de 15°C. Se trasladaron por vía terrestre al Laboratorio de Peces Marinos del departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) (Figura 6).

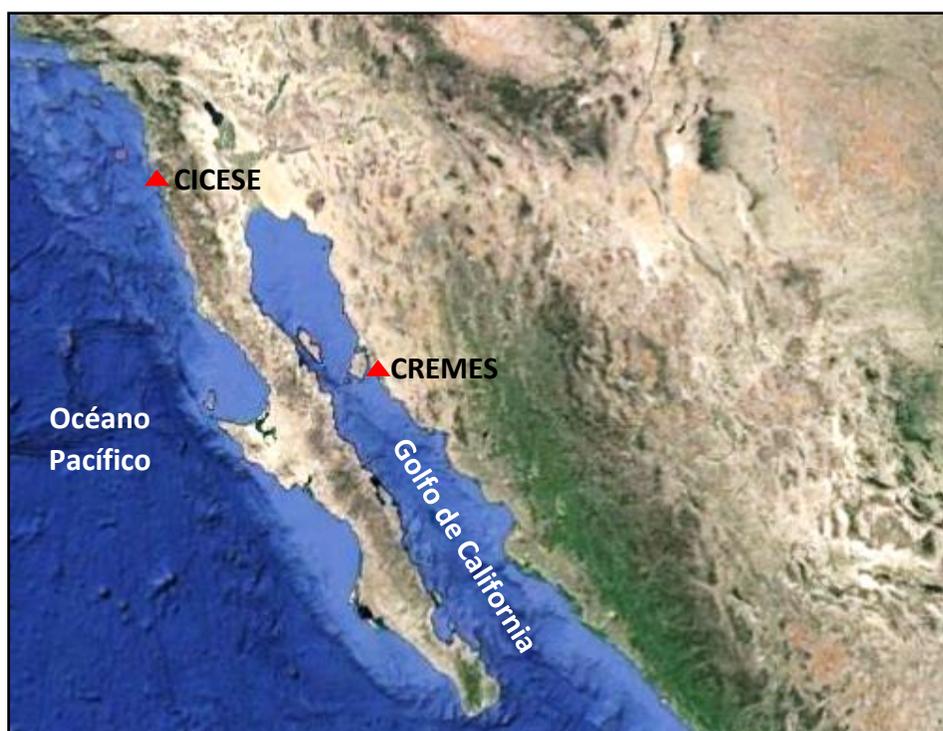


Figura 6. Ubicación del CREMES y del CICESE. El CREMES está ubicado en Bahía Kino, Sonora a los 28°52'30.42"N y 112° 1'52.24"O y el CICESE se ubica en Ensenada, Baja California a los 31°52'9.46"N y 116°40'7.38"O.

Una vez en el laboratorio de Peces Marinos, los huevos fueron aclimatados gradualmente (aumentando 2°C/h) de 15 a 23°C, una vez que alcanzaron los 23°C fueron sembrados a una densidad de 50 huevos por litro, en una incubadora cilíndrica de fondo cónico con capacidad de 2000 l. En estas condiciones se llevó a cabo la primera etapa del cultivo larvario y comprendió de los 0 a los 23 días después de la eclosión (DDE). A partir los 2 DDE y hasta los 17 DDE, las larvas se alimentaron tres veces al día con rotíferos

Brachionus plicatilis, a una densidad de 5 rotíferos por mililitro. A partir del día 18 DDE y hasta el día 22 DDE, las larvas se alimentaron con rotíferos y nauplios de *Artemia*, disminuyendo gradualmente la cantidad de rotíferos y aumentando la de nauplios diariamente a una proporción de 4:1, 3:2 2:3, 1:4 y 0:5 organismos por mL. Tanto los rotíferos como los nauplios, fueron enriquecidos con ORI-GREEN (SKRETTING) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Durante el cultivo larvario los organismos estuvieron expuestos a las siguientes condiciones físicas y químicas: un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, temperatura de 23.4 ± 0.4 °C, salinidad de 34.4 ± 0.4 ppm, oxígeno de 5.4 ± 0.4 mg/L, saturación de oxígeno de 79.4 ± 4.9 %, pH de 8.1 ± 0.2 y amonio de 0.6 ± 0.3 mg/L.

2.2 Exposición a diferentes temperaturas (24 a 120 DDE)

2.2.1 Tratamientos de temperatura

Durante esta segunda etapa del cultivo, se utilizaron cuatro tratamientos de temperatura 18, 22, 26 y 30°C. Cada tratamiento contó con tres replicas, y cada unidad experimental consistió en un tanque de cultivo de forma cuadrada de plástico color azul y capacidad de 48 litros. La temperatura del agua del tanque azul se mantuvo con un baño maría (evitando que el agua de los tratamientos se mezclara y se produjera la pseudoreplicación asociada con el uso de los sistemas de recirculación ya que el agua recirculada puede transportar moléculas que produzcan efectos no deseados entre réplicas). Para lograr mantener la temperatura de cada tratamiento a baño maría, cada tanque azul se colocó dentro de un tanque de mayor tamaño con forma ovalada con agua. En estos tanques la temperatura del agua se mantenía con un enfriador (Aqualogic, DELTA STAR DS-5 HP ½) en el tratamiento de 18°C y tres enfriadores/calentadores (Aqualogic, DELTA STAR DSHP-6 HP ¾) en los tratamientos de 22, 26 y 30°C (Figura 7)

En cada tanque azul fueron colocadas 400 larvas de 0.0055 ± 0.001 g y 0.91 ± 0.13 cm (1200 larvas por tratamiento), las cuales fueron aclimatadas aumentando o bajando la temperatura del agua gradualmente desde 23°C (temperatura a la que se mantuvieron en la etapa de incubación) hasta cada una de las cuatro temperaturas de los distintos tratamientos.

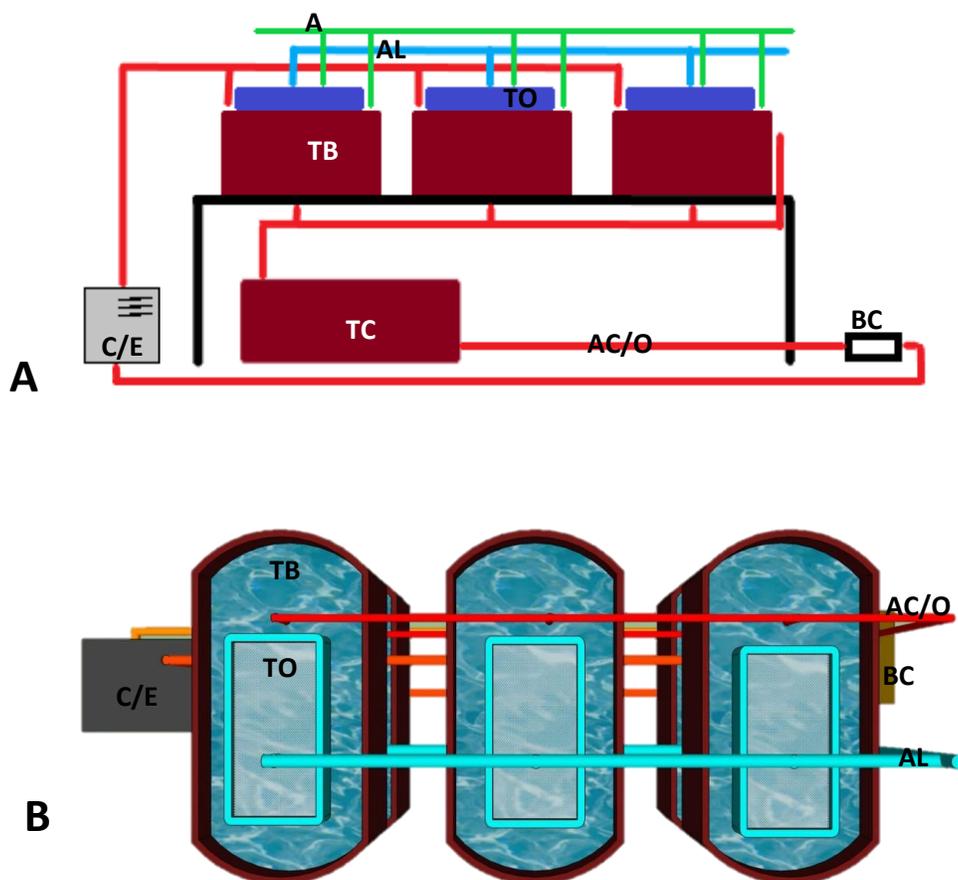


Figura 7. Diagrama del sistema de cultivo donde se mantuvieron los organismos a diferentes temperaturas (18, 22, 26 y 30°C). A, Vista frontal; B, Vista aérea (en esta imagen se omitió la línea de aireación para simplificación de la misma); TB, Tanque utilizado para poder realizar el efecto baño maría; TO, Tanque donde se colocaron a los organismos; TC, Tanque de compensación; BC, Bomba centrífuga; C/E, Calentador o enfriador de agua; A, Línea de aireación; AL, Línea de agua limpia; AC, Línea de agua caliente o fría (depende del tratamiento de temperatura utilizado).

Durante esta etapa, de los 24 a los 27 DDE las larvas fueron alimentadas con nauplios de *Artemia* previamente enriquecida con ORI-GREEN (SKRETTING) a una densidad de 5 organismos por mL. A partir los 28 DDE y hasta los 37 DDE se realizó el cambio de alimentación con alimento vivo por alimento formulado, por lo cual se disminuyó gradualmente la cantidad de *Artemia* de 5 hasta 0 organismos por mL, y se les suministró alimento formulado OTOHIME[®] A1 a saciedad aparente (considerada como el momento en el que se suministra alimento a los organismos y estos ya no lo consumen). De los 38 a los 120 DDE las larvas se alimentaron a saciedad aparente con alimento formulado el cual fue cambiando de diámetro de acuerdo al tamaño de los organismos. Los alimentos utilizados fueron OTOHIME[®] A1, A2, B1, B2, C1 y C2 y SKRETTING Marine MX con 46% de proteína, 12% de lípidos y 1.2% de fibra, de 2.5 y 3 milímetros de diámetro.

2.2.2 Monitoreo de parámetros físicos y químicos

Diariamente a las 8:00 y 16:00 horas se midieron la temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y porcentaje de saturación de oxígeno con un analizador multiparametros YSI Pro 2030, el pH con un potenciómetro de mesa Orion 290A+ y el amonio (NH_4^+) con un Kit API® siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para mantener una buena calidad del agua, cada unidad experimental contaba con entrada de agua constante, equivalente a 6 recambios por día.

2.2.3 Biometrías

Antes de realizar las biometrías los organismos se anestesiaron de uno en uno con una inmersión en una solución de agua de mar con triclaína a 50 mg/L. Se realizaron cinco biometrías a 30 organismos por tratamiento, a los 48, 50, 73, 102 y 120 DDE, en cada biometría se registraron la longitud total (LT) y la longitud patrón (LP) (distancia desde el extremo anterior del organismo hasta el inicio del complejo caudal, justo donde termina el pedúnculo e inicia la aleta caudal (UNAM, 2012)) con un ictiometro FMB2 AQUATIC ECO-SYSTEMS, INC® y el peso con una balanza analítica Scout™ OHAUS con capacidad de 200g. Una vez realizada la biometría, los organismos fueron colocados en agua de mar para su recuperación y posteriormente devueltos al tanque de donde se habían tomado.

2.2.4 Identificación sexual

Se realizaron cuatro muestreos, a los 52, 72, 102 y 120 DDE, tomando 15 organismos por tratamiento (5 por replica). Los organismos fueron medidos, pesados y eutanasiados con una dosis letal de triclaína (150 mg/L) (Noga, 2010). Posteriormente fueron fijados en solución Davidson durante 48 horas y luego conservados en alcohol al 70%, hasta su procesamiento histológico (Anexo A).

Para el análisis histológico, cada ejemplar fue disecado dependiendo del tamaño que tenía. A los organismos con una longitud total menor a 2 cm se les practicó un corte transversal de cuerpo completo quedando divididos en dos secciones: anterior y posterior. A los organismos con una longitud total mayor a 2 cm, correspondientes a las muestras de 52, 72 y 102 DDE, se les extrajo la cavidad abdominal y se dividió en parte anterior y posterior para su procesamiento histológico. Los organismos de 120 DDE se disecaron y se les extrajeron las gónadas para su procesamiento histológico (Figura 8)

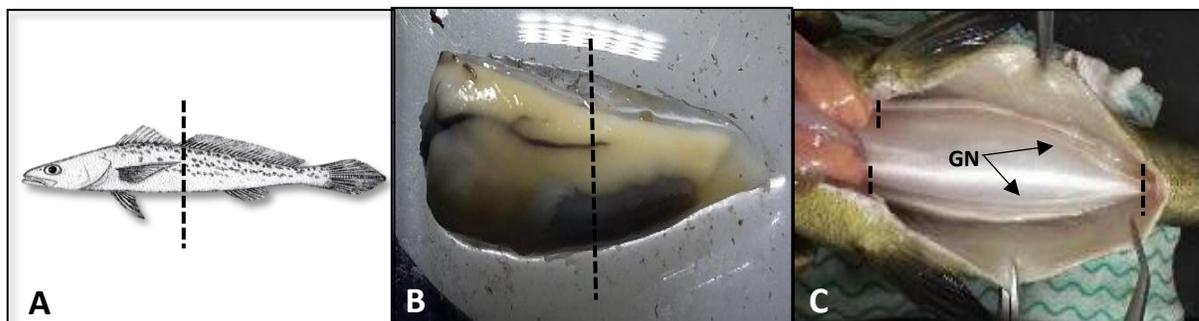


Figura 8. Disección histológica de *Totoaba macdonaldi* de acuerdo con su longitud total (LT). A, Zona de corte en peces menores de 2 cm de LT; B, Cavity abdominal de peces mayores a 2 cm de LT de 52, 72 y 102 DDE (lugar donde se encuentran las gónadas, en la parte dorso lateral de la vejiga gaseosa); C, Disección ventral de *Totoaba macdonaldi* con 120 DDE, en donde se muestran las gónadas (GN) dispuestas a lo largo de la vejiga gaseosa. Línea punteada, zona donde se realizó el corte de los tejidos antes de ser incluidos en parafina.

Los organismos completos o los tejidos fueron deshidratados y aclarados en un Procesador de tejidos TP 1020 LEICA® (Anexo B). A continuación, se colocaron en casetes histológicos y se incluyeron en parafina en un Incluidor de tejidos EG 1160 LEICA®, posteriormente se realizaron los cortes histológicos de 6 µm de espesor en un Micrótopo rotatorio semimotorizado RM2245 LEICA®, las secciones se montaron en portaobjetos mediante un baño de flotación con Gelatin Laboratory Grado G8-500^(F) Fisheer Scientific® a 40 °C. El desparafinado e hidratación de los tejidos se realizó con inmersiones en xileno y etanol, y posteriormente se tiñeron con hematoxilina-eosina (Anexo C).

2.3 Identificación del sexo y análisis de estradiol y testosterona en sangre (121 al 213 DDE)

2.3.1 Mantenimiento de organismos

A los 121 DDE, los organismos expuestos a los tratamientos con las cuatro temperaturas 18, 22, 26 y 30°C fueron trasladados a un sistema de recirculación, integrado por doce tanques de fibra de vidrio de color azul con capacidad de 500 L. Este sistema tenía un tanque de sedimentación de 500 L, un filtro mecánico capacidad de 500 L con partículas de plástico de 4 milímetros de diámetro, un filtro biológico con capacidad de 500 L con medio filtrante Kaldnes K-1, una bomba Franklin Electric 57KM de ¾ HP y un enfriador/calentador aqualogic® 13393 XB-10. Al trasladar los organismos al sistema de recirculación se mantuvieron las réplicas que se tenían durante la etapa de exposición a las diferentes temperaturas (Figura 9). Durante esta etapa los peces fueron aclimatados gradualmente hasta alcanzar una temperatura común

de 26 °C, temperatura en la que se mantuvieron de los 121 a los 180 DDE. A partir de los 181 hasta los 213 DDE se mantuvieron a 16°C.

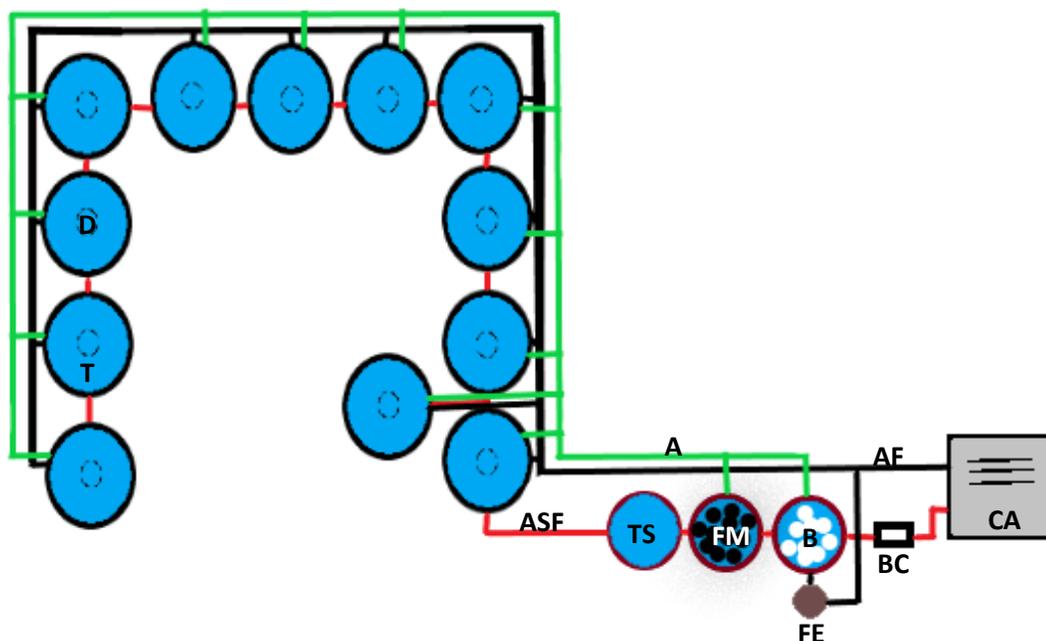


Figura 9. Diagrama del sistema de cultivo donde se mantuvieron los organismos de los 121 a los 213 DDE. T, Tanques (500 L); TS, Tanque de sedimentación; FM, Filtro mecánico; B, Biofiltro; BC, Bomba centrífuga; CA, Calentador de agua; AF, Línea de agua filtrada; ASF, Línea de agua sin filtrar; FE, Fraccionador de espuma; A, línea de aireación; D, Desagüe.

2.3.2 Mantenimiento y monitoreo de los parámetros físicos y químicos

Los organismos se alimentaron 3 veces al día a las 8:00, 12:00 y 16:00 horas a saciedad aparente con alimento para peces marinos SKRETTING Marine MX con 46% de proteína, 12% de lípidos y 1.2% de fibra. El tamaño de las partículas alimenticias fue de 3, 3.5, 4, 4.5, 5,5 y 6 milímetros de diámetro, el cual se fue ajustando de acuerdo al tamaño de los organismos. Diariamente se monitoreó la temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y porcentaje de saturación de oxígeno con un analizador multiparametros YSI Pro 2030 y cada semana se monitoreo el pH con un potenciómetro de mesa Orion 290A+, y el amonio (NH_4^+), los nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-) con los Kit API® siguiendo las intrusiones del fabricante.

Se realizó un recambio de agua diario del 30%, así como dos retro-lavados diarios (8:00 y 16:00 h) del filtro mecánico.

2.3.3 Biometrías

Se realizaron tres biometrías a los 151, 184 y 213 DDE. Se registró la longitud total (LT) y la longitud patrón (LP) (ictiometro FMB2 AQUATIC ECO-SYSTEMS, INC ®) y el peso (balanza SK-2000WP NSF® con capacidad de 2000g ± 1g) de 30 organismos por tratamiento.

2.3.4 Análisis de estradiol y testosterona

Treinta organismos de cada tratamiento se anestesiaron mediante inmersión en agua de mar con tricaina a una concentración de 150 mg/L. Posteriormente se extrajo la sangre de la vena caudal con jeringas TERUMO SYRINGE 21G y se colocó en tubos heparinizados K2 EDTA de 7.2 mg para evitar su coagulación. Para separar el plasma, la sangre se colocó en tubos Eppendorf y se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos. El plasma se colocó en tubos estériles para microcentrifuga Eppendorf ClickSeal™ de 1.5 ml y se congeló a -80 °C en un ultracongelador REVCO ExF Thermo SCIENTIFIC® hasta el momento de su análisis.

Las concentraciones de testosterona se cuantificaron con el Kit ELISA 40251 de NEOGEN y las de estradiol estradiol con el kit 402110 de NEOGEN. Las lecturas de testosterona y estradiol se realizaron en un espectrofotometro VARIOSKAKN FLASH Thermo SCIENTIFIC®, siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.3.5 Identificación del sexo

A cincuenta organismos de cada tratamiento se les tomaron los datos de la longitud total (LT), longitud patrón (LP) con un ictiometro FMB2 AQUATIC ECO-SYSTEMS, INC®, y el peso total con una balanza SK-2000WP NSF® con capacidad de 2000 g ± 1g. Posteriormente fueron eutanasiados con una dosis letal de tricaina (150 mg/L) (Noga, 2010). Se les extrajeron las gónadas, y se fijaron con solución Davidson durante 24 horas, luego fueron colocadas en alcohol al 70% hasta el momento en que fueron procesadas para su análisis histológico el cual se realizó de la forma descrita en la sección 2.2.4

2.4 Medición de gonias y gonadogenesis

2.4.1 Determinación del diámetro de gonias

Las muestras histológicas fueron visualizadas en un microscopio OLYMPUS CX31 y las imágenes analizadas con el programa INFINITY ANALYZE-INFINITY 1 2CB sn 197173. El diámetro de las gonias se definió como el promedio del diámetro mayor y el diámetro menor. Se midieron únicamente las células de mayor tamaño, ya que se consideró que las células más grandes son las que fueron cortadas por el ecuador y son el reflejo real de su diámetro.

2.4.2 Gonadogenesis

La descripción de la gonadogenesis se realizó con el material histológico correspondiente a las etapas de exposición a las diferentes temperaturas, tomando en cuenta las características de la gónada y la longitud de los organismos, tanto en hembras como en machos.

2.5 Análisis de datos

Para conocer si había diferencias en los valores de las variables físicas y químicas entre los tratamientos y diferencias en la longitud y el peso entre los organismos expuestos a las diferentes temperaturas, los valores de las diferentes variables se analizaron con una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía y una prueba a posteriori de Tukey ($P < 0.05$) cuando se encontraron diferencias. Para todas las variables anteriores se verificaron los supuestos de normalidad mediante una prueba Komologorov-Smirnov y homocedasticidad mediante una prueba de Levene. Los datos de las variables que no pasaron las pruebas de normalidad y homocedasticidad fueron transformados, una vez transformados, se verificó que pasaran los anteriores supuestos antes de analizarse estadísticamente. Los datos expresados en porcentaje (sobrevivencia y porcentaje de saturación de oxígeno) se transformaron con la función arco seno de la raíz cuadrada del porcentaje antes de analizarse estadísticamente. Para conocer si había diferencias en la concentración de estradiol y testosterona, longitud patrón y peso entre hembras y machos de un mismo tratamiento, los datos de estas variables se analizaron mediante la prueba t de student. Las pruebas de ANOVA, Komologorov-Smirnov, Levene y t de student se realizaron con el programa STATISTICA® versión 10.

La relación de la proporción de sexo respecto a la temperatura se evaluó mediante el análisis de tablas de contingencia con la prueba de χ^2 .

Capítulo 3. Resultados

3.1 Exposición a diferentes temperaturas (24 a 120 DDE)

3.1.1 Supervivencia

Se encontraron diferencias significativas en la supervivencia de los organismos cultivados a diferentes temperaturas ($P=0.002$). El mayor porcentaje de supervivencia fue encontrado en el tratamiento con temperatura de 22°C (33.24%) y el menor en el tratamiento de 18°C (9.67%). En dos de las réplicas del tratamiento de 30°C se murieron todos los organismos, por tal motivo en los análisis estadísticos inferenciales no se incluyó este tratamiento, sólo se analizaron mediante estadística descriptiva (Figura 10).

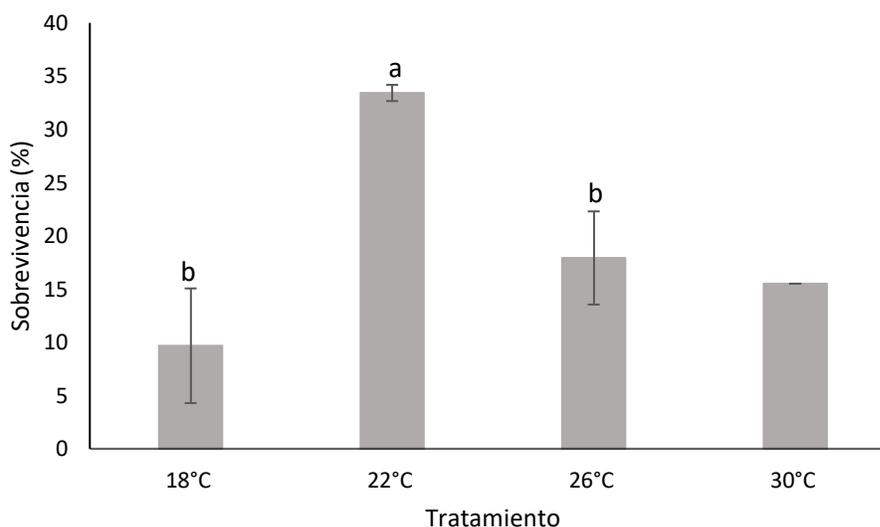


Figura 10. Porcentaje de supervivencia de totoabas expuestas a diferentes tratamientos de temperatura. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P=0.002$). NOTA: El tratamiento de 30 °C no se incluyó en el análisis estadístico. La supervivencia en dicho tratamiento está representada por una sola réplica, ya que la mortalidad en las otras dos se debió a fallas mecánicas del sistema y no al tratamiento de temperatura.

3.1.2 Longitud patrón y peso de *Totoaba macdonaldi* de 120 DDE expuesta a diferentes tratamientos de temperatura

Los organismos expuestos al tratamiento de 30°C crecieron más, pero mediante estadística inferencial solo se pudieron comparar los tratamientos de 18, 22 y 26 °C. En estos tratamientos se encontraron diferencias significativas entre la longitud patrón de los organismos ($P<0.001$). Los organismos expuestos al tratamiento 26°C crecieron más ($LP=13.43\pm 0.22$ cm) que los expuestos a 22 y 18°C (Figura 11) (Anexo D).

Se encontraron diferencias significativas entre el peso (W) de los organismos ($P < 0.001$). Los organismos expuestos al tratamiento de 26°C pesaron más ($W = 39.7 \pm 5.0$ g) que los expuestos a 22 y 18°C (Figura 12).

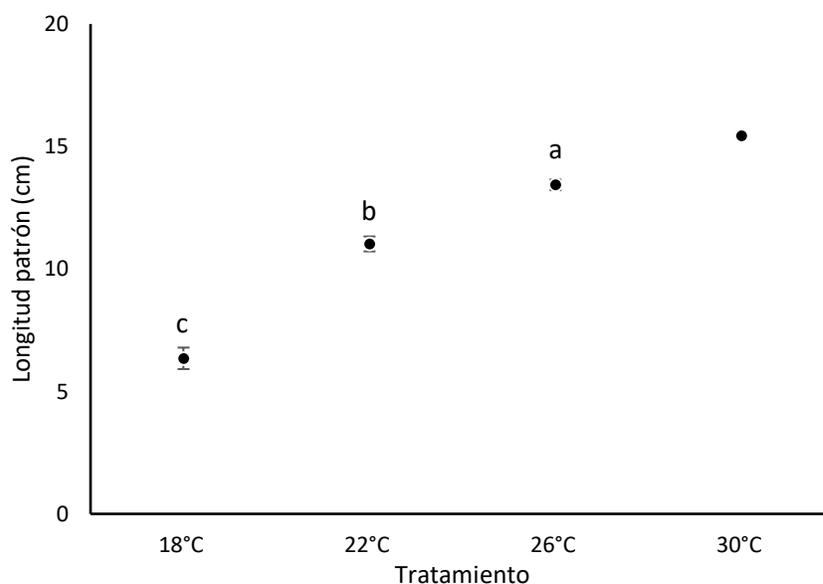


Figura 11. Longitud patrón (LP) de *Totoaba macdonaldi* a los 120 DDE expuesta a diferentes tratamientos de temperatura. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.001$). El tratamiento de 30 °C no se incluyó en el análisis estadístico debido a la muerte de los organismos de dos de las réplicas.

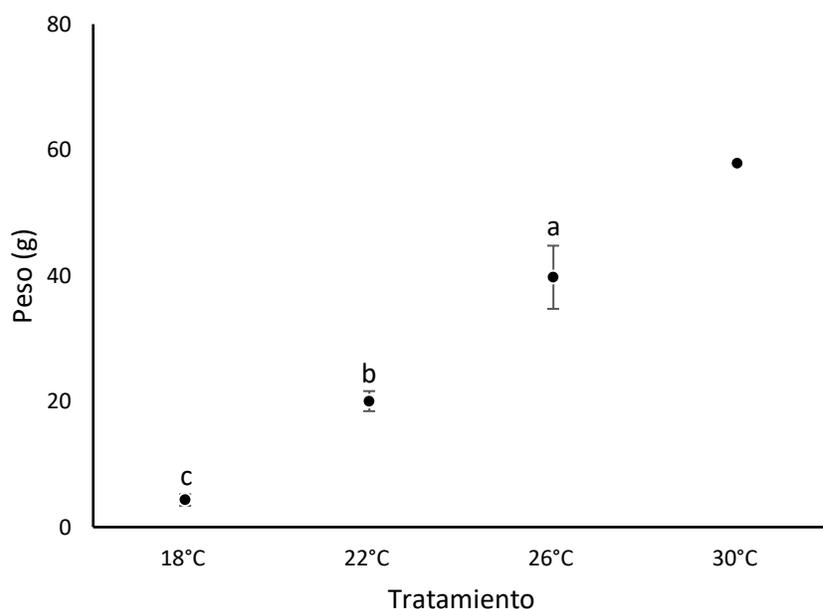


Figura 12. Peso (W) de *Totoaba macdonaldi* a los 120 DDE expuesta a diferentes tratamientos de temperatura. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.001$). El tratamiento de 30 °C no se incluyó en el análisis estadístico debido a la muerte de los organismos de dos de las réplicas.

3.1.3 Análisis de parámetros físicos, químicos y poblacionales

No se encontraron diferencias significativas en la salinidad de los diferentes tratamientos ($P=0.101$). Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en el porcentaje de saturación de oxígeno ($P=0.001$), en el oxígeno disuelto ($P<0.001$), en el pH ($P<0.001$), en el nitrógeno amoniacal total (NAT) ($P<0.001$) y en la densidad a los 120 DDE ($P<0.001$) (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros físicos, químicos y biológicos en el cultivo de *Totoaba macdonaldi* expuesta a diferentes temperaturas a los 120 DDE.

Tratamiento	18 °C	22 °C	26 °C	30 °C
Temperatura (°C)	18.86 ± 0.15 ^c	22.54 ± 0.11 ^b	25.84 ± 0.08 ^a	29.04
Salinidad (ups)	34.14 ± 0.14	34.19 ± 0.01	34.23 ± 0.04	34.40
Saturación de oxígeno (%)	97.43 ± 3.36 ^a	71.96 ± 4.09 ^b	76.41 ± 5 ^b	78.75
Oxígeno (mg/L)	7.36 ± 0.28 ^a	5.07 ± 0.29 ^b	5.13 ± 0.35 ^b	5.09
pH	7.83 ± 0.02 ^a	7.69 ± .01 ^b	7.59 ± 0.02 ^c	7.59
Nitrógeno amoniacal total (NAT) (mg/L)	0.61 ± 0.06 ^b	2.65 ± 0.14 ^a	2.73 ± 0.28 ^a	2.98
Densidad a los 120DDE (g/L)	3.47 ± 1.89 ^b	55.84 ± 5.5 ^a	101.08 ± 23.02 ^a	25.44

*El análisis estadístico inferencial ANOVA y prueba de Tukey solo se realizó entre los tratamientos de 18, 22 y 26 °C, excluyéndose el tratamiento de 30°C debido a la mortalidad que se presentó.

3.1.4 Características de las gónadas de los peces de 52, 72, 102 y 120 DDE expuestos a diferentes temperaturas.

3.1.4.1 Características de las gónadas a los 52 DDE

Las gónadas de los organismos expuestos a los diferentes tratamientos de temperatura (18, 22, 26 y 30 °C) a los 52 DDE estaban indiferenciadas, no presentaron características como cavidad ovárica o una distribución del tejido germinal característica del ovario o del testículo. Solo en las gónadas de los organismos expuestos a 18°C se observaron células germinales (gonias). En las gónadas de los organismos expuestos a 22, 26 y 30 °C solo se observó tejido somático y vascular (Figura 13).

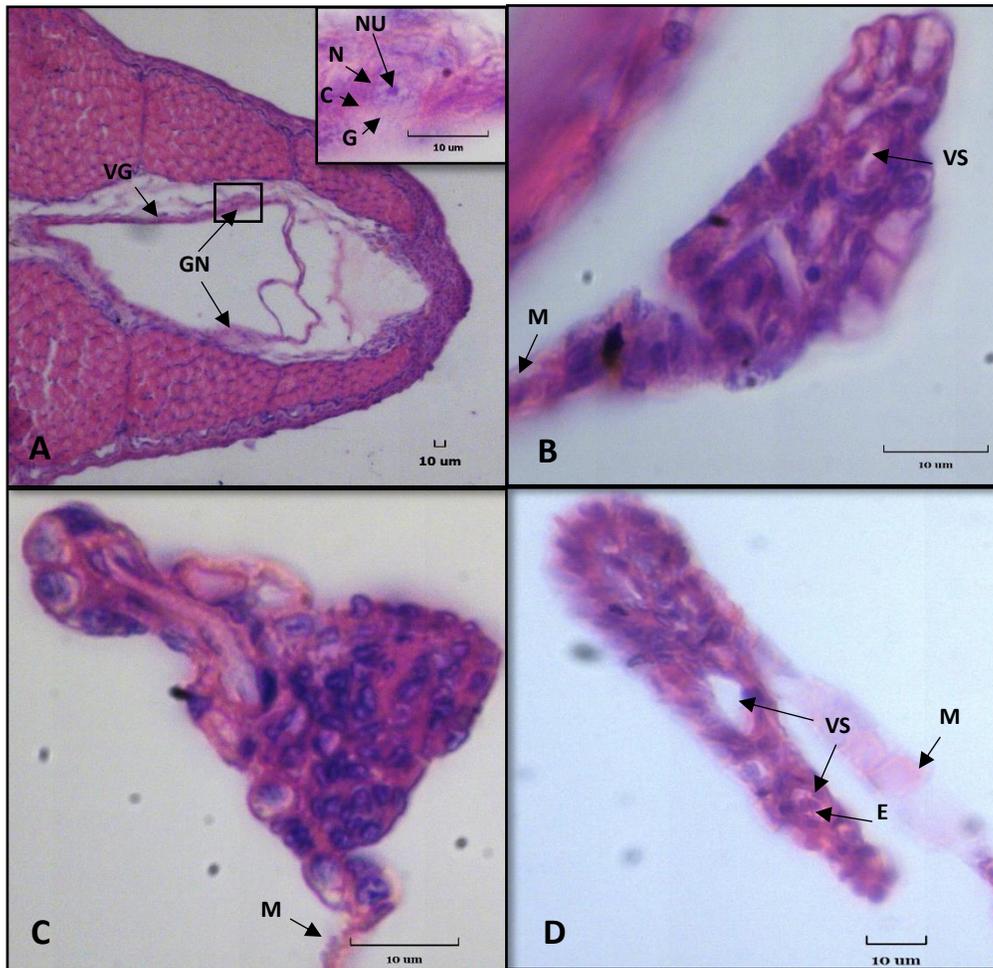


Figura 13. Cortes transversales de gónada indiferenciada de *Totoaba macdonaldi* de 52 DDE expuestos a diferentes tratamientos de temperatura. A, 18 °C (LT= 1.9 cm); B, 22 °C (LT= 3 cm); C, 26°C (LT= 4.2 cm); D, 30 °C (LT= 5.1 cm); LT), Longitud total del organismo; GN, Gónadas; VG, Vejiga gaseosa; M, Mesenterio; G, gonias; N, Núcleo; UN, Nucléolo; C, Citoplasma; E, Eritrocito y VS, Vaso sanguíneo.

3.1.4.2 Características de las gónadas a los 72 DDE

Las gonadas de los organismos expuestos a los tratamientos de 18 y 22°C, estaban indiferenciadas, no se observaron gonias, solo tejido somático y vascular. En los organismos expuestos al tratamiento de 26°C se observaron gonadas indiferenciadas y gonadas con cavidad ovárica. En los cortes longitudinales de gónadas indiferenciadas se observaron células germinales y tejido somático, mientras que en las gónadas cortadas trasversalmente se identificó la cavidad ovárica y tejido somático y vascular. En los organismos expuestos al tratamiento de 30°C se observaron gónadas indiferenciadas y gónadas con cavidad ovárica en formación, ya que presentaban elongaciones en sus bordes ventrales, las cuales darán origen a la cavidad ovárica. Tanto en las gónadas indiferenciada como en las que presentaron cavidad ovárica en formación, sólo se observó tejido somático y tejido vascular (Figura 14).

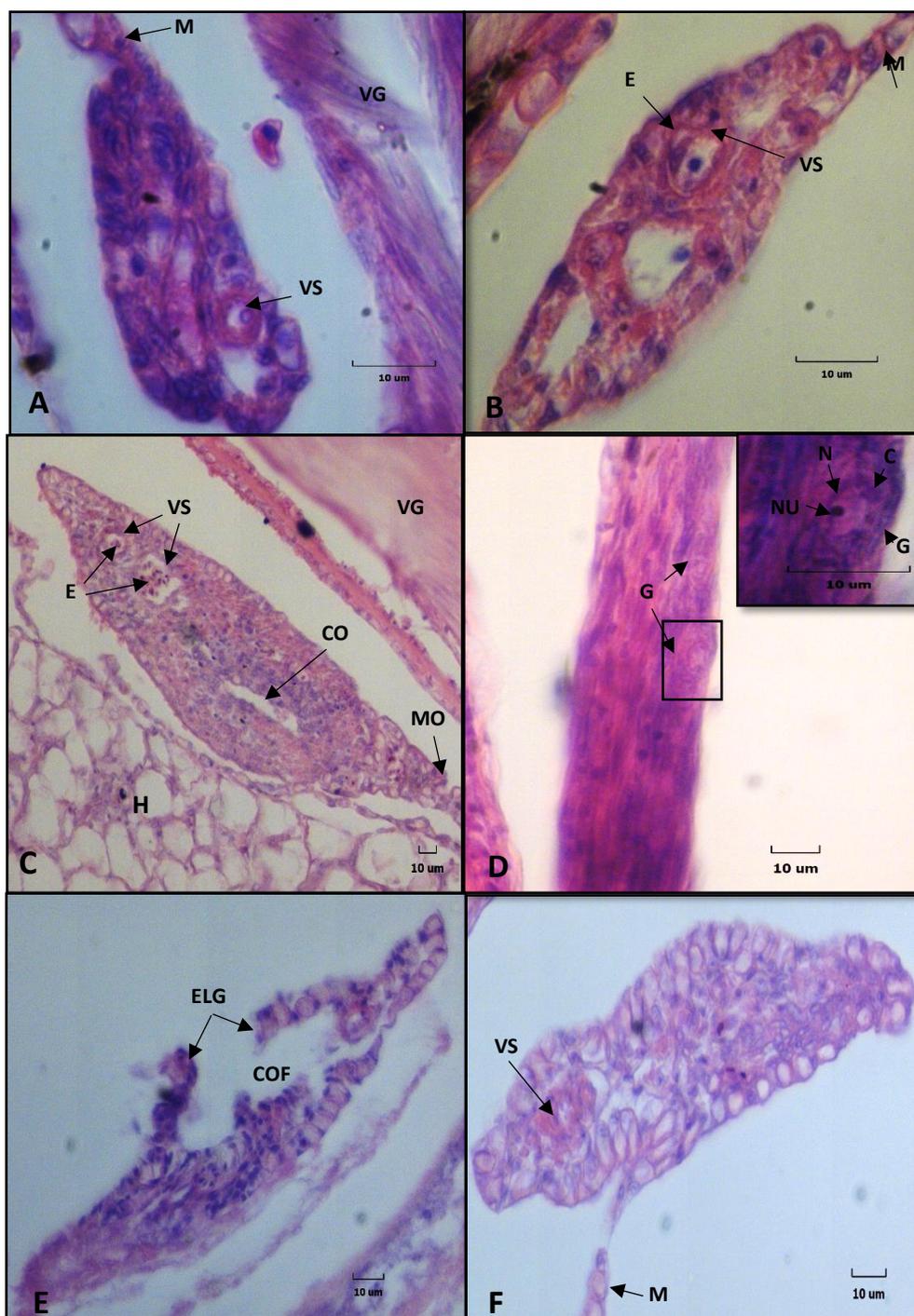


Figura 14. Cortes transversales y longitudinales de gónada de *Totoaba macdonaldi* de 72 DDE expuestos a diferentes tratamientos de temperatura. A, 18°C (LT=4.1cm); B, 22°C (LT=7.5 cm); C 26°C (LT=10.4cm); D, 26°C (LT=8.4cm); E, 30 °C (LT=10.5 cm); F, 30 °C (LT=10.5 cm); LT, Longitud total del organismo; GN, Gónadas; VG, Vejiga gaseosa; H, Hígado; M, Mesenterio; MO, Mesovario; ELG, Elongación de la gónada; COF, Cavidad ovárica en formación; CO, Cavidad ovárica; G, gonias; N, Núcleo; UN, Nucléolo; C, Citoplasma; E, Eritrocito y VS, Vaso sanguíneo.

3.1.4.3 Características de las gónadas a los 102 DDE

A los 102 DDE las gónadas de los organismos expuestos a los tratamientos de 18 y 22°C estaban indiferenciadas y solo se observó tejido somático y vascular. En organismos expuesto al tratamiento de 26°C se observaron ovarios cuya característica era una túnica albugínea de gran espesor con respecto al espesor del epitelio germinal. Hay presencia de cavidad ovárica y proliferación de ovogonias en la parte medular de la gónada, rodeando parcialmente la cavidad ovárica. En los organismos expuestos al tratamiento de 30 °C se observaron ovarios con ovogonias en la parte medular de la gónada rodeando toda la periferia de la cavidad ovárica (Figura 15).

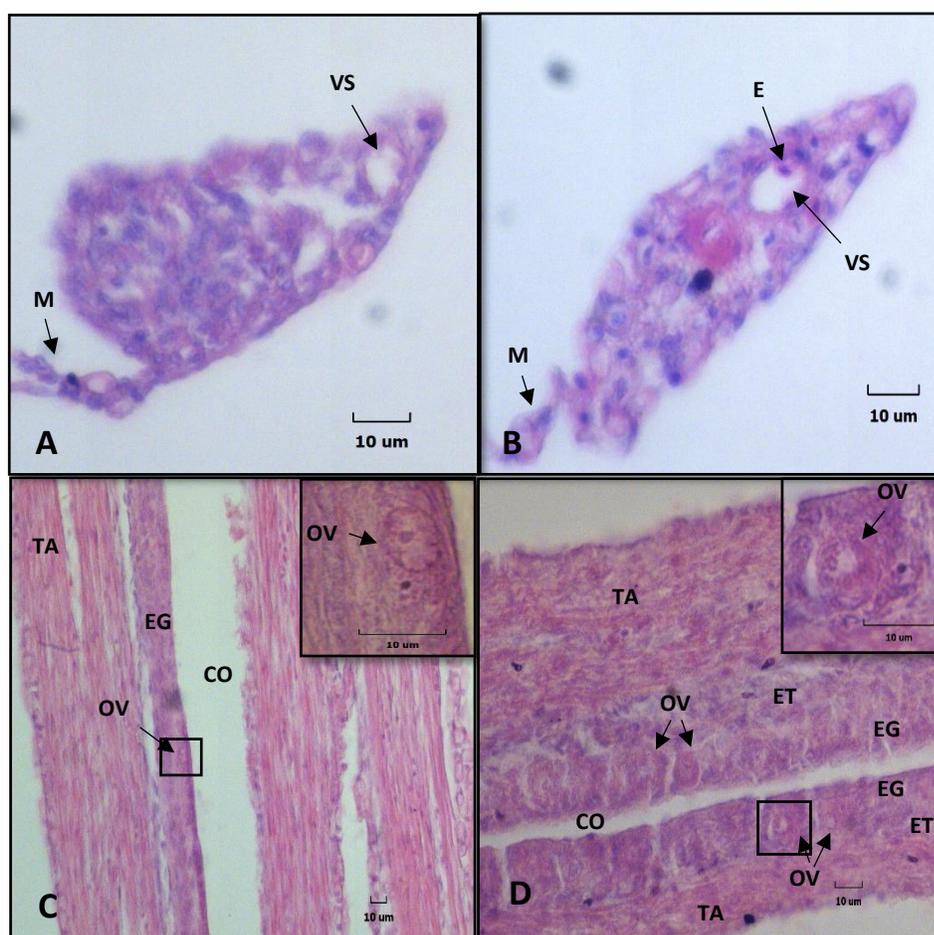


Figura 15. Cortes transversales y longitudinales de gónada de *Totoaba macdonaldi* de 102 DDE expuestas a los diferentes tratamientos de temperatura. A, 18 °C (LT=5.6cm); B, 22 °C (LT=9cm); C, 26 °C (LT=13cm); D, 30 °C (LT=14cm); LT, Longitud total del organismo; M, Mesenterio; CO, Cavidad ovárica; OV, Ovogonia; TA, Túnica albugínea; ET, Estroma EG, Epitelio germinal; E, Eritrocito y VS, Vaso sanguíneo.

3.1.4.4 Características de las gónadas a los 120 DDE

A los 120 DDE, las gónadas de totoaba expuestas al tratamiento de 18°C se encontraron en tres diferentes grados de desarrollo: indiferenciadas, con cavidad ovárica en formación y gónadas con cavidad ovárica formada. En ninguno de los tres casos se observaron gonias u ovogonias, solo se observó tejido somático y vascular (Figura 16). En los organismos expuestos a los tratamientos de 22 y 30°C se observaron ovarios con cavidad ovárica y tejido germinal dispuesto en la parte medular de la gónada bordeando totalmente la cavidad ovárica. En los organismos expuestos al tratamiento de 26 °C se observaron testículos con espermatogonias en algunas partes de la periferia de la gónada (Figura 17).

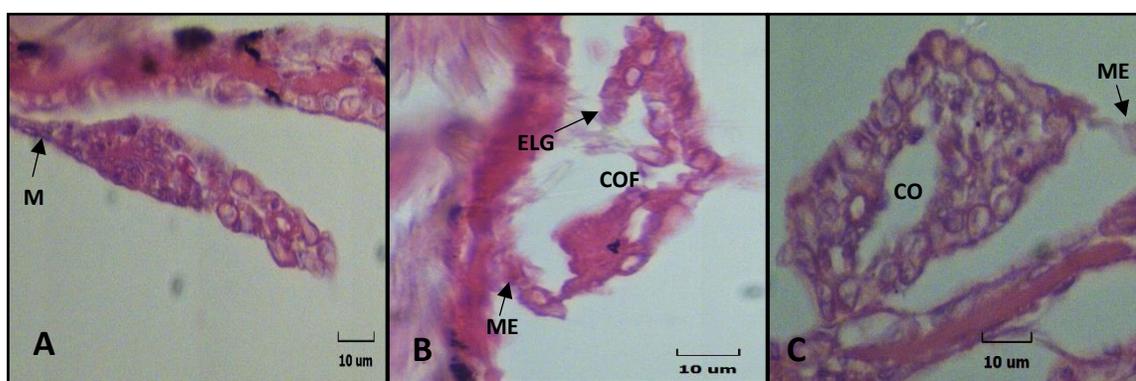


Figura 16. Cortes transversales de gónada de *Totoaba macdonaldi* de 120 DDE expuestas al tratamiento de 18°C. A, Gónada indiferenciada (LT=6cm); B, Gónada con cavidad ovárica en formación (LT= 6cm) y C, Gónada con cavidad ovárica (LT=8cm) LT, Longitud total del organismo; M, Mesenterio; ME, Mesovario CO, Cavidad ovárica; COF, Cavidad ovárica en formación y ELG, Elongación de la gónada.

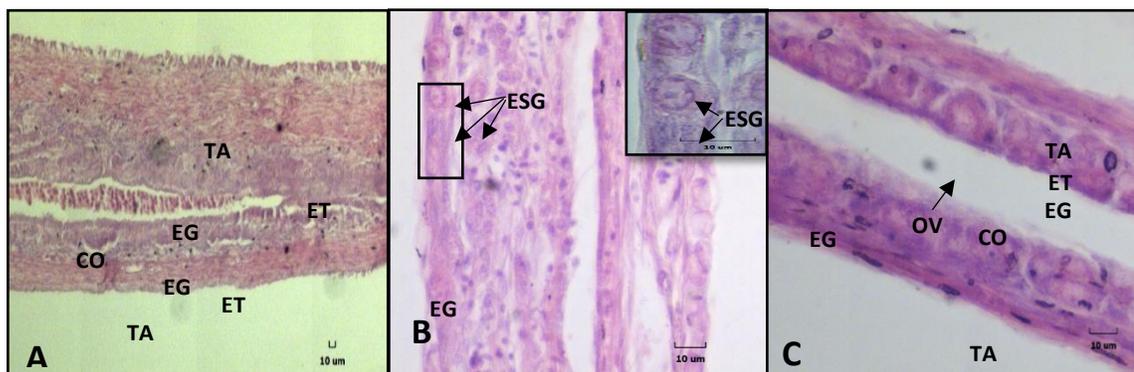


Figura 17. Cortes longitudinales de gónadas de *Totoaba macdonaldi* de 120 DDE expuestas a diferentes tratamientos de temperatura. A, 22°C (LT=16 cm); B, 26°C (LT=15 cm) C, 30 °C (LT=16.8 cm); LT, Longitud total del organismo; CO, Cavidad ovárica; OV, Ovogonia; ESG, Espermatogonia; TA, Túnica albugínea; ET, Estroma EG, Epitelio germinal; E, Eritrocito y VS, Vaso sanguíneo.

3.2 Identificación del sexo y análisis de estradiol y testosterona en sangre (121 a 213 DDE)

3.2.1 Diferencias entre el ovario y el testículo en *Totoaba macdonaldi* a los 213 DDE

El ovario de totoaba a los 213 DDE se caracterizó por tener el epitelio germinal en la parte medular de la gónada rodeando las lamelas ováricas, las cuales delimitan la cavidad ovárica; una túnica albugínea en la periferia de la gónada y estroma ovárico entre el tejido germinal y la túnica albugínea. Los testículos tienen una túnica albugínea que envuelve al órgano, seguido hacia el interior por el tejido germinal, en donde las espermatogonias se ubican dentro de lóbulos que se desarrollan de la periferia hacia el centro de la gónada (Figura 18).

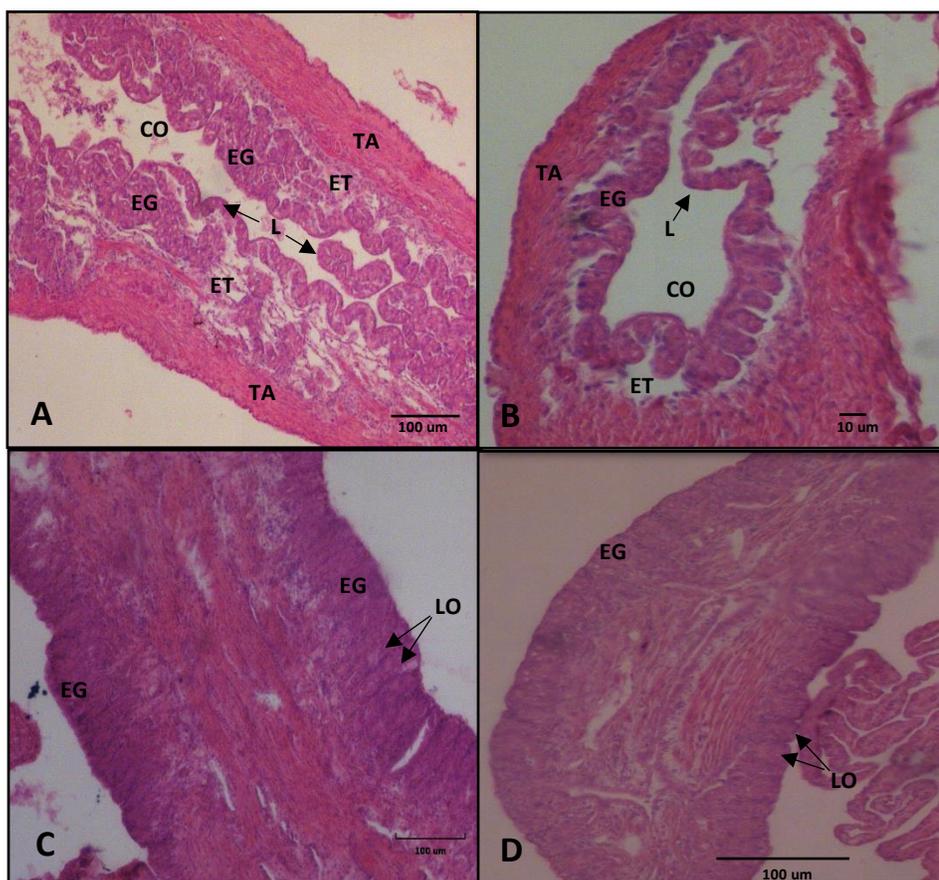


Figura 18. Ovarios y testículos de *Totoaba macdonaldi* de 213 DDE. A, Corte longitudinal de ovario (LT=23 cm); B, Corte transversal de ovario (LT=22cm); C, Corte longitudinal de testículo (LT= 27.5 cm); D, Corte transversal de testículo (LT= 25.5cm); LT, Longitud total del organismo; TA, Túnica albugínea; ET, Estroma; EP, Epitelio germinal; L, Lamelas ováricas y LO, Lóbulos.

3.2.2 Porcentaje de hembras y machos

En el tratamiento de 18°C se encontró un menor porcentaje de machos (47.92 %) que de hembras (52.08%), mientras que en los tratamientos de 22, 26 y 30 °C el porcentaje de machos fue mayor que el de hembras (Figura 19). Sin embargo, el análisis de tablas de contingencia con la prueba de χ^2 no reveló que hubiera una influencia de la temperatura sobre la proporción sexual.

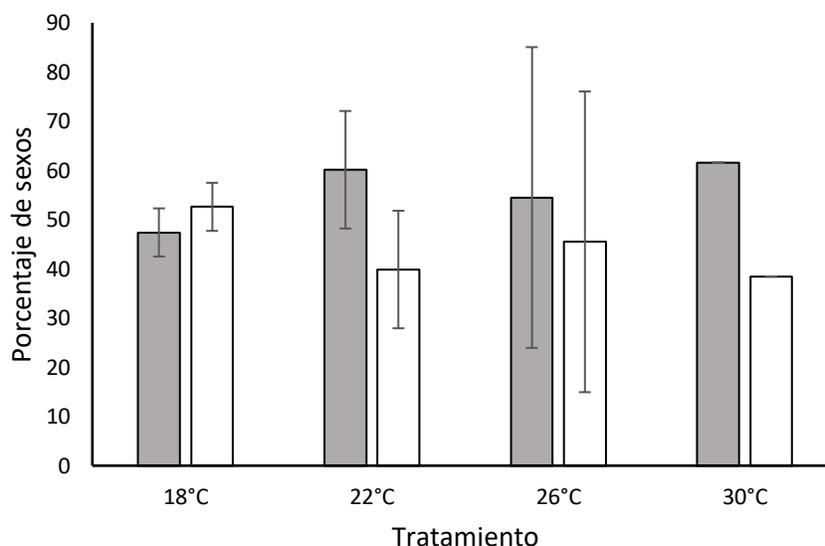


Figura 19. Porcentaje de machos y hembras de *Totoaba macdonaldi* expuestas a diferentes tratamientos de temperatura. Las barras grises representan el porcentaje de machos y las barras blancas el porcentaje de hembras. El número de organismos analizados fue diferente para cada tratamiento (18°C: n=48, 22°C: n=43, 26°C: n=46 y 30°C: n=46).

3.2.3 Longitud corporal y peso de la *Totoaba macdonaldi* a los 213 DDE

A los 213 DDE los organismos expuestos al tratamiento de 30°C eran más grandes; sin embargo, mediante estadística inferencial solo se compararon los tratamientos de 18, 22 y 26°C. Se encontraron diferencias significativas en la longitud patrón entre los organismos expuestos a estos tres tratamientos ($P=0.001$). Los organismos expuestos al tratamiento de 26°C crecieron más ($LP = 22.13 \pm 0.55$ cm) que los expuestos a 18 y 22°C (Figura 20) (Anexo D). También se encontraron diferencias significativas en el peso entre los organismos expuestos a estos tres tratamientos de temperatura ($P=0.001$). Los organismos expuestos al tratamiento de 26°C tenían mayor peso (173.4 ± 9.7 g) que los expuestos a 18 y 22°C (Figura 21).

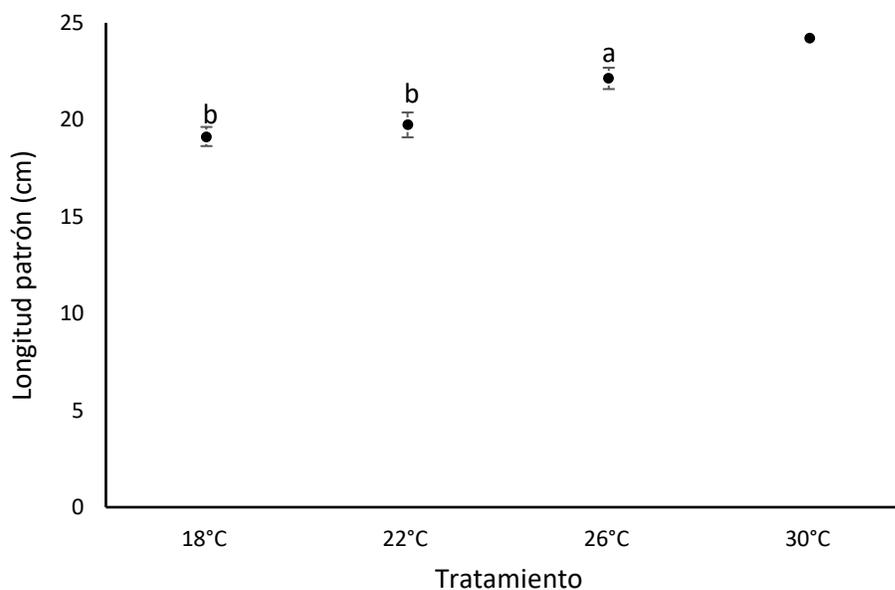


Figura 20. Longitud patrón (LP) de *Totoaba macdonaldi* a los 213 DDE. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas ($P=0.001$). El tratamiento de 30°C no tiene letra sobre la barra debido a que este tratamiento no se incluyó en el análisis estadístico inferencial.

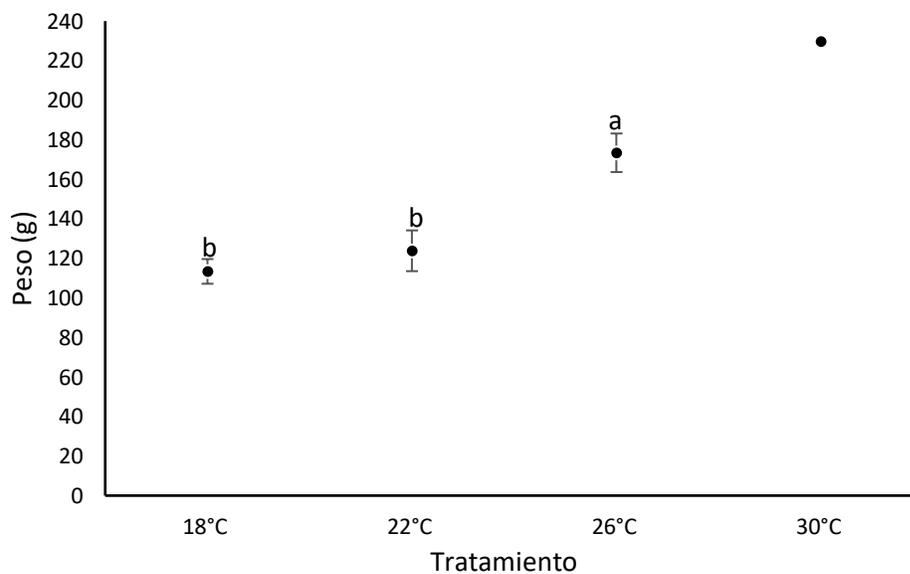


Figura 21. Peso de *Totoaba macdonaldi* a los 213 DDE. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas ($P<0.05$). El tratamiento de 30°C no tiene letra sobre la barra debido a que este tratamiento no se incluyó en el análisis estadístico inferencial.

No se encontraron diferencias significativas entre la longitud patrón de los machos y hembras expuestos a un mismo tratamiento de temperatura, 18°C ($P=0.649$), 22°C ($P=0.391$) y 30°C ($P=0.0582$) (Figura 22). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre el peso de machos y hembras expuestos a los mismos tratamientos de temperatura de 18°C ($P=0.543$) y 22°C ($P=0.472$) pero si entre los machos y las hembras expuestos al tratamiento de 26°C ($P=0.029$) (Figura 23)

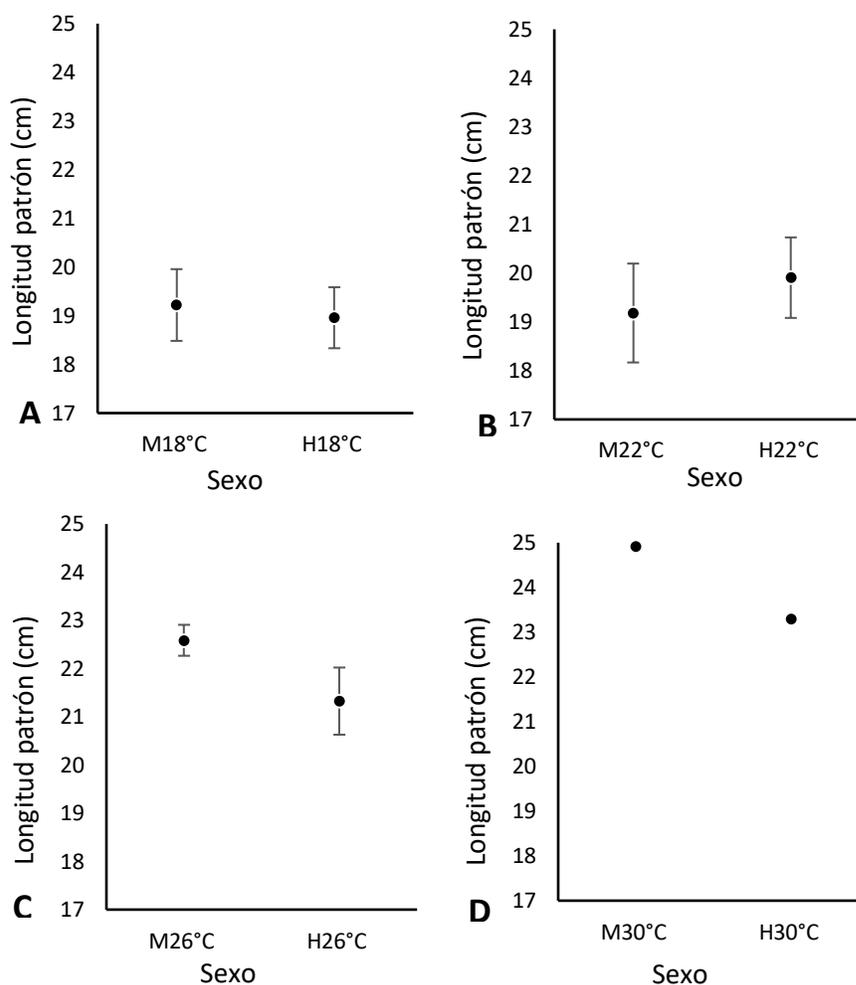


Figura 22. Longitud patrón (LP) de hembras y machos de *Totoaba macdonaldi* a los 213 DDE expuestos a diferentes temperaturas. El tratamiento de 30°C no se incluyó en el análisis estadístico inferencial. M, Machos; H, Hembras, A, 18°C; B, 22°C; C, 26°C; D, 30°C.

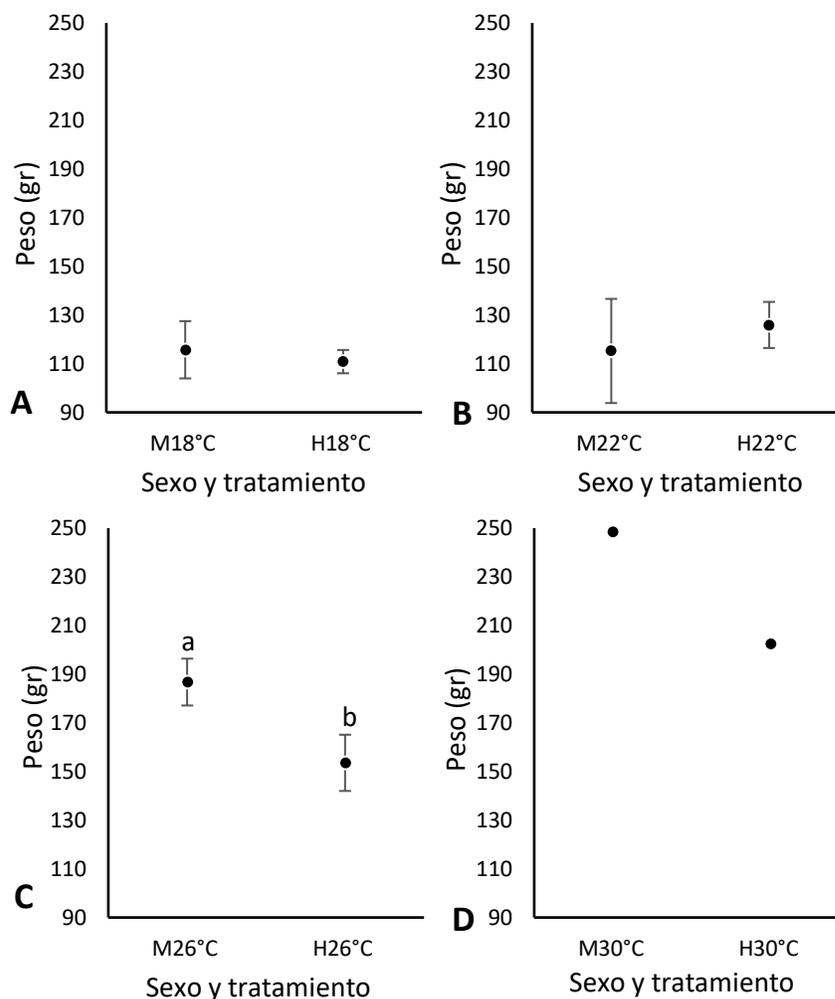


Figura 23. Peso de machos y hembras de *Totoaba macdonaldi* a los 213 DDE expuestos a diferentes temperaturas. A, 18°C; B, 22°C; C, 26°C; D, 30°C. Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticas. El tratamiento de 30°C no se incluyó en el análisis estadístico inferencial. M, Machos; H, Hembras.

3.2.4 Características del ovario de *Totoaba* a los 213 DDE

La mayoría de los ovarios de los organismos expuesto inicialmente al tratamiento de 18 °C tuvieron lamelas poco desarrolladas, con ovogonias en la periferia, bordeando la cavidad ovárica, estroma poco abundante y túnica albugínea abundante en la periferia de la gónada. Los ovarios de las totoabas expuestas inicialmente al tratamiento de 22 °C, tenían las lamelas desarrolladas con ovogonias y ovocitos primarios en la periferia, estroma abundante con folículos y túnica albugínea no tan abundantes. Los ovarios de totoaba con tratamiento inicial de 26°C, presentaban lamelas desarrolladas con ovogonias abundantes o escasas, estroma abundante con pocos folículos o sin folículos y túnica albugínea poco abundante en la periferia de la gónada. En cuanto a los organismos expuestos inicialmente al tratamiento de 30 °C, los ovarios tenían lamelas muy desarrolladas que cubrían total o parcialmente la cavidad ovárica, ovogonias

que llenaban total o parcialmente las lamelas, estroma y la túnica albugínea poco o muy abundantes y con o sin folículos (Figura 24).

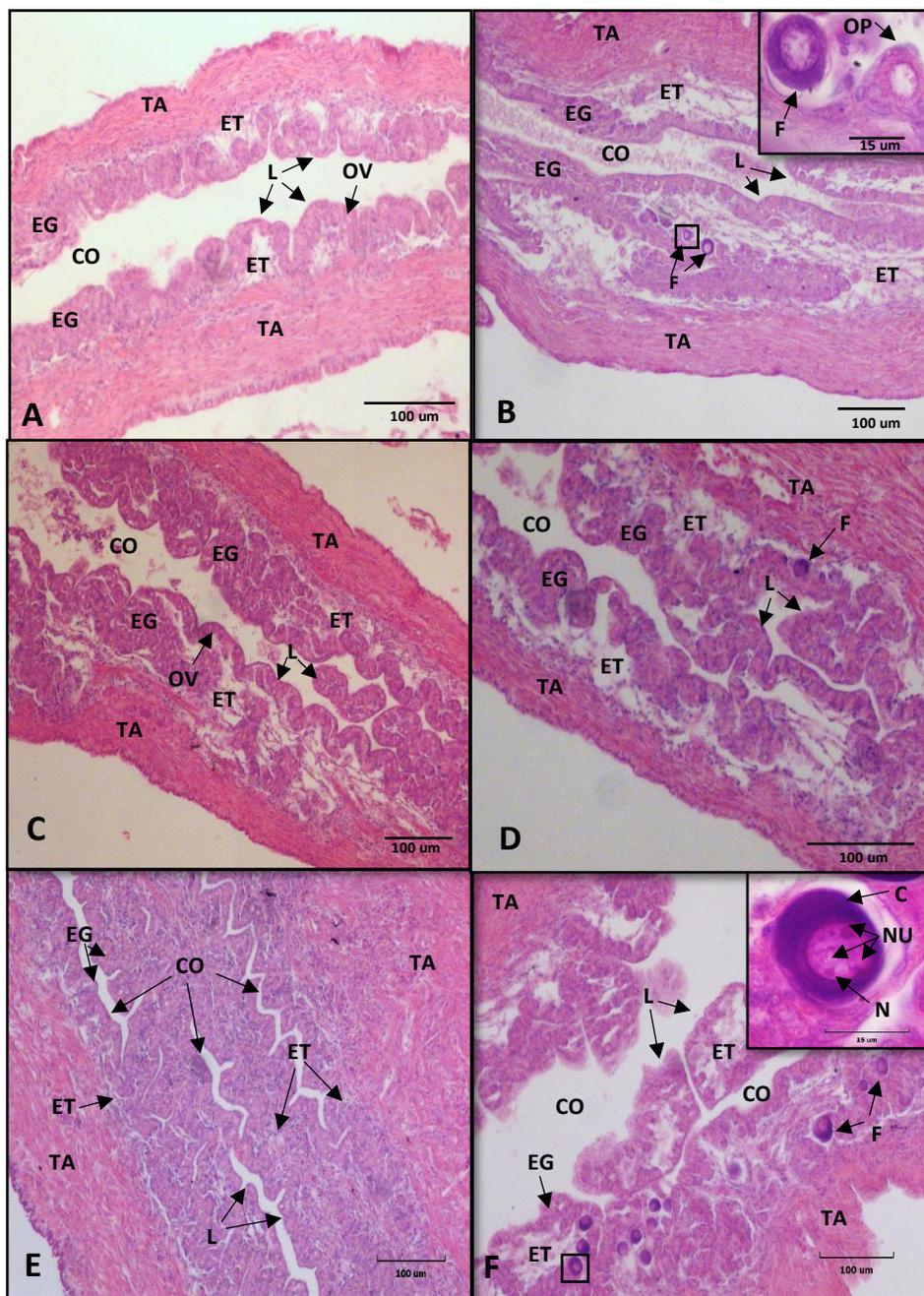


Figura 24. Cortes longitudinales de ovario de *Totoaba macdonaldi* de 213 DDE expuestos a diferentes tratamientos iniciales de temperatura. A, 18°C (LT=23.5cm); B, 22°C (LT=24.5cm); C, 26°C (LT=23cm) D, 26°C (LT=29cm); E, 30°C (LT=24.5); F, 30°C (LT= 23.5 cm); LT, Longitud total del organismo; CO, Cavidad ovárica; OV, Ovogonia; TA, Túnica albugínea; ET, Estroma; EG, Epitelio germinal; L, Lamelas o crestas; F, Folículo; OP, Ovocito primario; N, Núcleo; UN, Nucléolo y C, Citoplasma.

3.2.5 Características del testículo de totoaba los 213 DDE

Los testículos de totoabas expuestas inicialmente al tratamiento de 18°C presentaban pocas espermatogonias en algunas partes de la periferia de la gónada y lóbulos poco desarrollados. Las totoabas expuestas inicialmente a 22°C tenían lóbulos definidos en toda la periferia de la gónada, dentro de los lóbulos se ubicaban las espermatogonias. En cuanto a las totoabas expuestas inicialmente al tratamiento de 26 y 30 °C tenían testículos con lóbulos desarrollados en toda la periferia de la gónada con espermatogonias distribuidas a lo largo de todos los lóbulos, en algunos testículos se observaron escasos cistos con espermatocitos o con espermátidas (Figura 25).

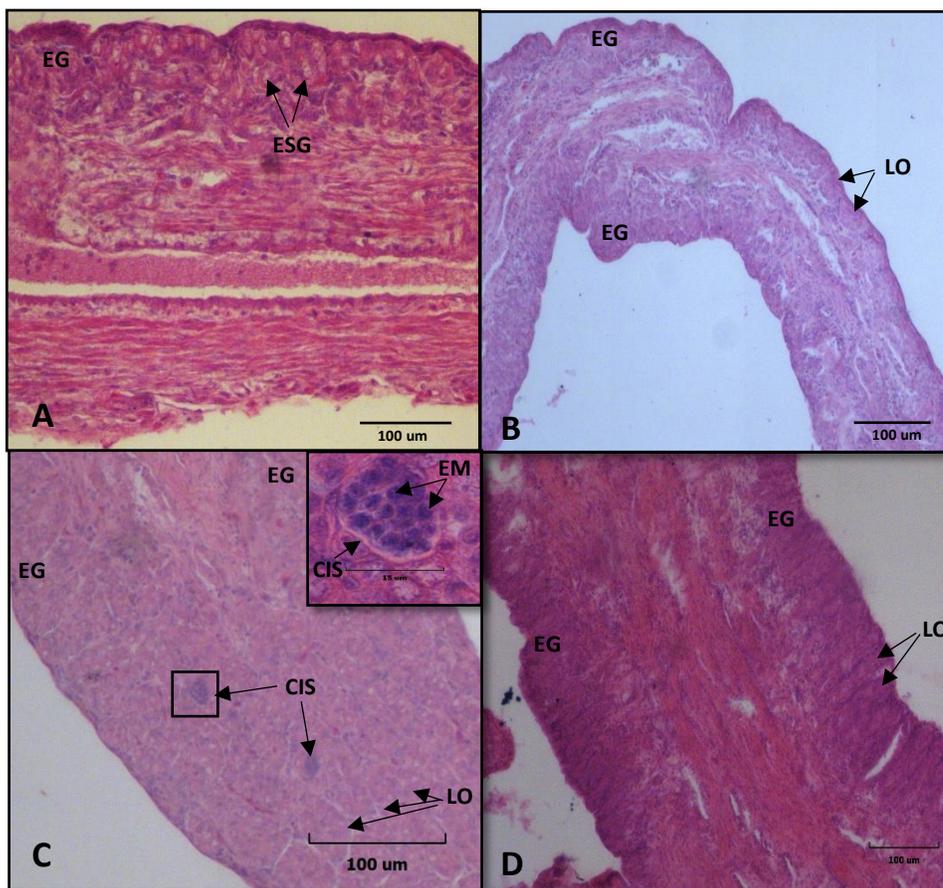


Figura 25. Cortes longitudinales de testículos de *Totoaba macdonaldi* de 213 DDE expuestos a diferentes tratamientos iniciales de temperatura. A 18 °C (LT=21 cm); B, 22°C (LT=20.5); C 26 °C (LT=26 cm); D, 30°C (LT=27.5 cm). LT, Longitud total del organismo; EG, Epitelio germinal; LO, Lóbulos; CIS, Cisto y EM, Espermatocito.

3.2.6 Gonias en proceso de división celular

En las gónadas de los organismos expuestos a los diferentes tratamientos se encontraron gonias en distintas etapas de división celular, la cuales se caracterizaron por la presencia de cromosomas en etapa de metafase o anafase (Figura 26).

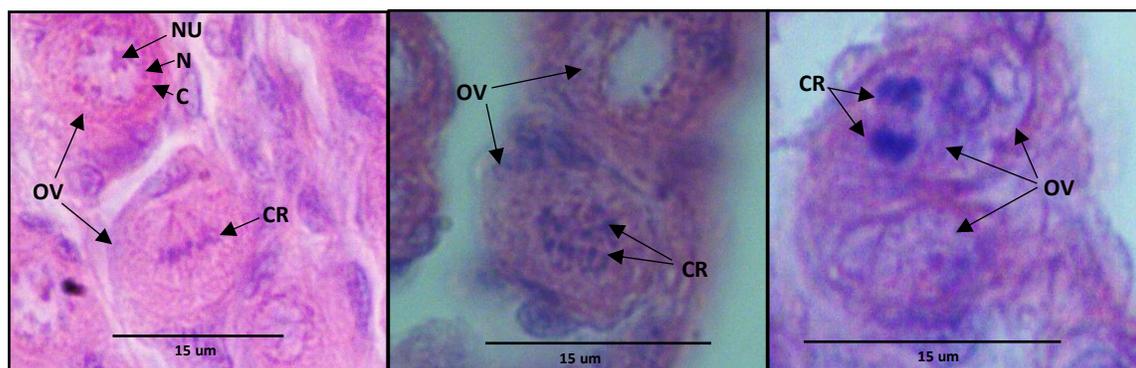


Figura 26. Gonias de *Totoaba macdonaldi* en diferentes estados de división celular. A, Metafase (LT=20.8cm); B, Anafase temprana (LT=23cm); C, Anafase (LT=27.5cm); LT, Longitud total del organismo; OV, Ovogonia; CR, cromosoma; UN, Nucléolo; N, Núcleo y C, Citoplasma.

3.2.7 Anomalías encontradas en las gónadas

Tanto en ovarios como en testículos de las totoabas expuestas a los diferentes tratamientos de temperatura se encontraron anomalías en las gónadas. En los ovarios se observaron cistos de espermatocitos, un arreglo celular común de los testículos, pero no de los ovarios. El porcentaje de ovarios con esta anomalía fue de 12% para los organismos expuestos a 18°C, 35% para los expuestos a 22°C, 25% para los expuestos a 26°C y 16.6 % para los expuestos a 30°C (Figura 27). En contraste, en los testículos se observó la presencia de una cavidad con células germinales en la periferia, similar a la cavidad ovárica de las hembras, el porcentaje de testículos con esta anomalía fue de 100% para los organismos expuestos al tratamiento de 18°C, 23% para los expuestos a 22°C, 19% para los expuestos a 26°C y 10.7 % para los expuestos a 30°C (Figura 28).

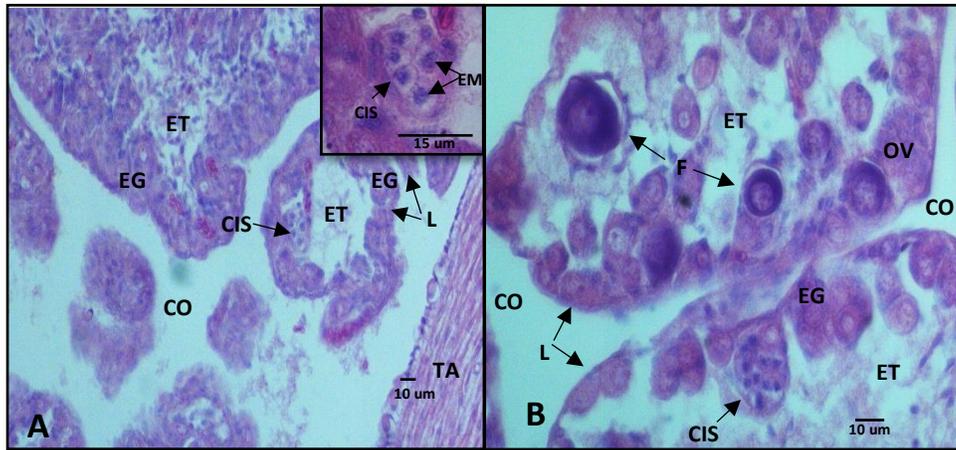


Figura 27. Corte longitudinal de ovario de *Totoaba macdonaldi* de 213 DDE expuesta al tratamiento de 18°. A, y B, muestran fotomicrografías con diferente aumento de un organismo de LT=18 cm. LT, Longitud total del organismo; CO, Cavity ovárica; OV, Ovogonia; TA, Túnica albugínea; ET, Estroma; EG, Epitelio germinal; L, Lamelas o crestas; F, Folículo; CIS, Cisto; y EM, Espermatozoido.

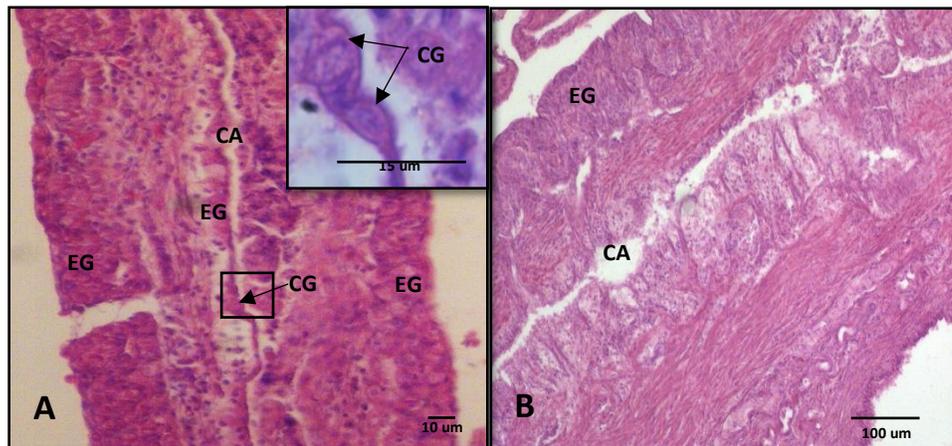


Figura 28. Cortes longitudinales de testículos de *Totoaba macdonaldi* de 213 DDE expuesta al tratamiento de 18°C. A, LT= 22 cm; B, LT= 26cm. LT, Longitud total del organismo; EG, Epitelio germinal; CA, Cavity y CG, Células germinales.

3.2.8 Análisis de estradiol y testosterona en sangre

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de estradiol ni de la testosterona en el plasma de la totoaba procedente de hembras y machos de un mismo tratamiento de temperatura ($P > 0.05$) (Figuras 29 y 30).

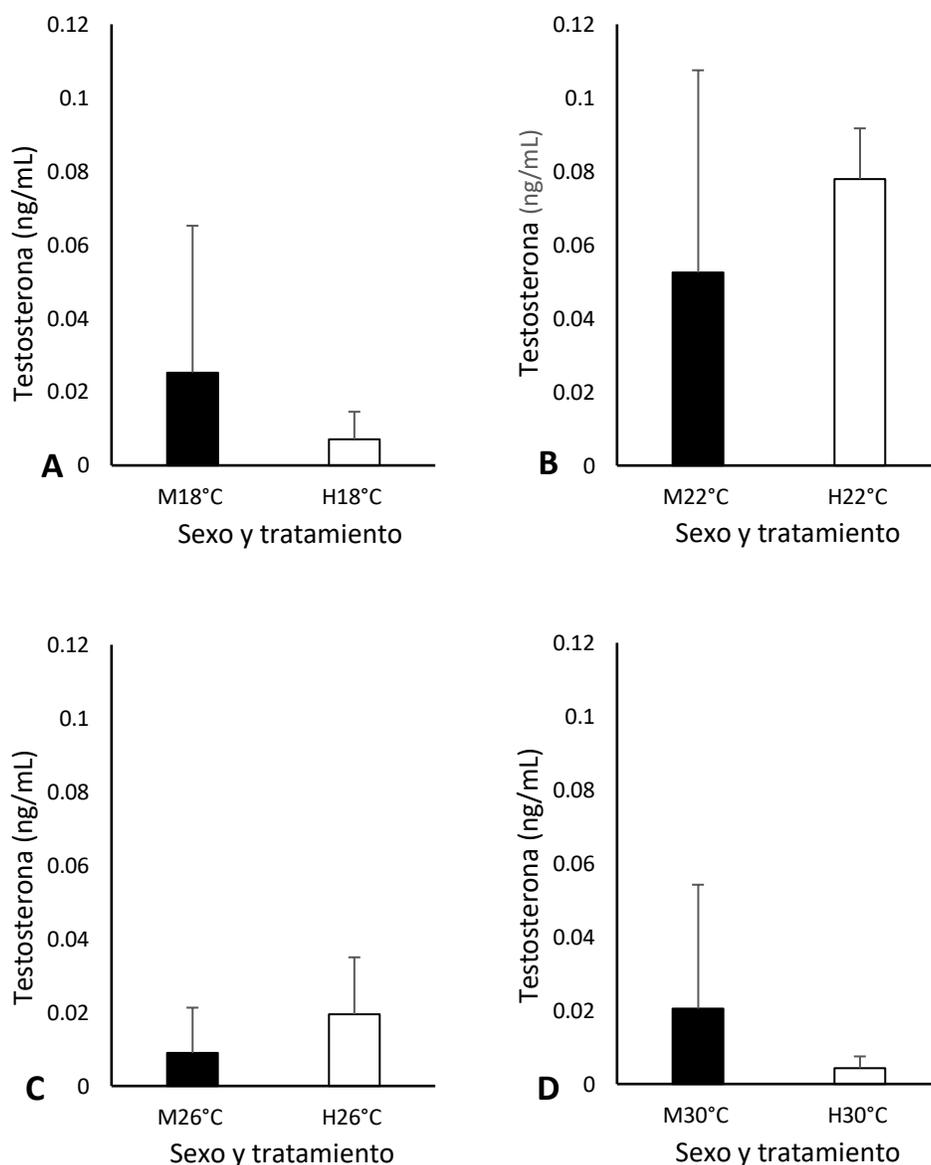


Figura 29. Niveles de testosterona en plasma de hembras y machos de *Totoaba macdonaldi* en diferentes tratamientos de temperatura. A, 18°C ($P=0.285$); B, 22°C ($P=0.474$); C, 26°C ($P=0.282$); D, Tratamiento de 30°C ($P=0.443$); M, Machos y H, Hembras. Barras negras, machos; Barras blancas, hembras. NOTA: para el análisis de los niveles de estradiol en el plasma se tomó como unidad experimental a cada organismo.

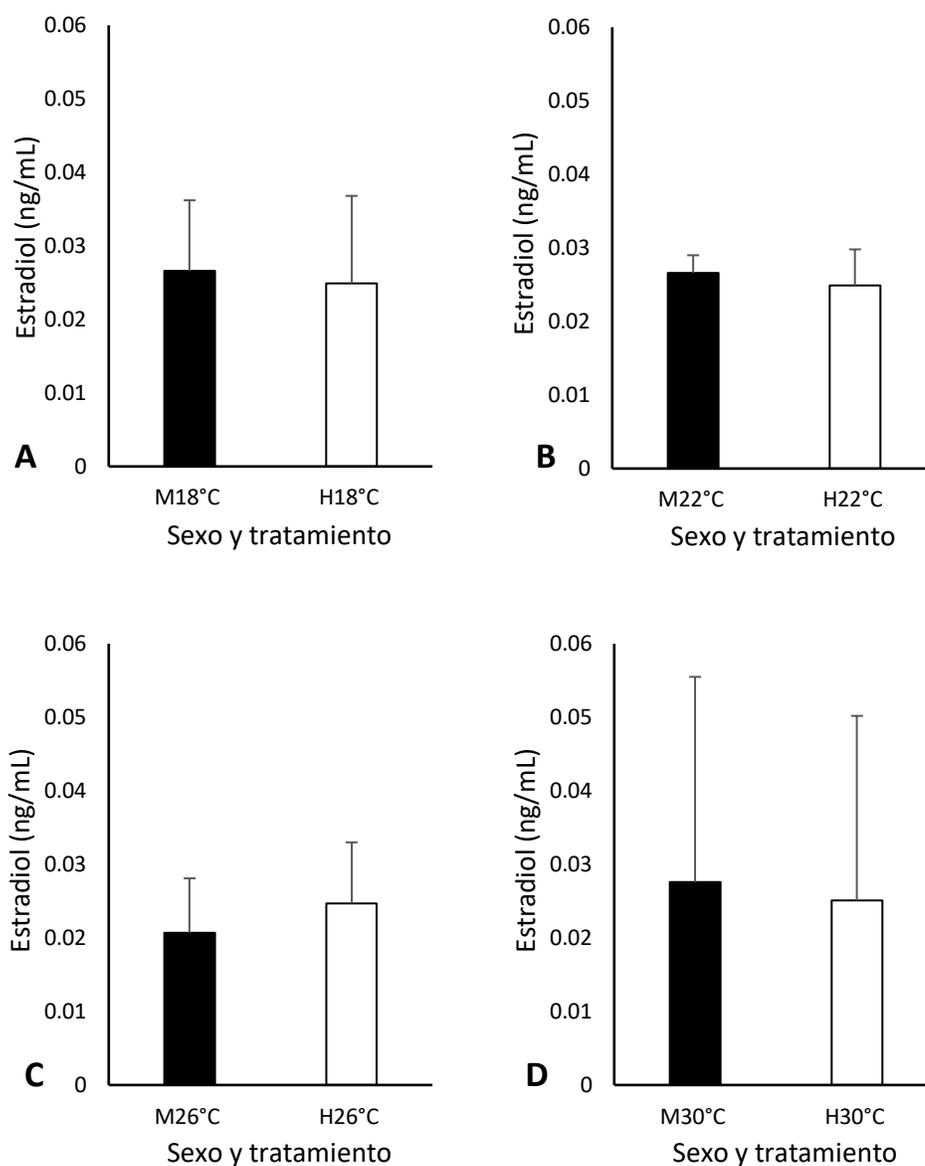


Figura 30. Niveles de estradiol en plasma de hembras y machos de *Totoaba macdonaldi* en diferentes tratamientos de temperatura. A, 18°C (P=0.855); B, 22°C (P=0.425); C, 26°C (P=0.477); D, 30°C (P=0.673); M, Machos; H, Hembras. NOTA: para el análisis de los niveles de estradiol en el plasma se tomó como unidad experimental a cada organismo.

3.3 Diámetro de gonias y génesis gonadal

3.3.1 Diámetro de células madre germinales

El diámetro de las células madre germinales tanto en hembras como en machos tuvo un intervalo de 10 a 12 μm , sin embargo, solo en los ovarios se encontraron células madre con diámetros de 13 μm .

3.3.2 Génesis ovárica

Para facilitar la descripción del ovario, su desarrollo se dividió en etapas de acuerdo a la aparición o crecimiento de los tejidos característicos de la gónada. En la primera etapa el ovario pasa por un estado indiferenciado. Es una estructura alargada y de un diámetro reducido, ligeramente aplanada y está dispuesta en el techo de la cavidad abdominal en los márgenes laterales definidos por la vejiga gaseosa y la pared de cuerpo (Figura 31). Durante esta etapa, la gónada se caracteriza porque solo se observan células somáticas y germinales, pero no se observa ningún tejido característico del ovario como lamelas, cavidad ovárica y estroma. En una segunda etapa se forman dos elongaciones, una en cada extremo del lado ventral de la gónada (superior e inferior), que crecen y se fusionan en sus extremos hasta formar la cavidad ovárica. En la tercera etapa, una vez formada la cavidad ovárica, se observó un crecimiento de la gónada y la proliferación de las gonias en algunas zonas de la región medular o central de la gónada, bordeando la cavidad ovárica. En una cuarta etapa, se observó una mayor proliferación de las ovogonias en la parte central de la gónada, bordeando total o parcialmente la cavidad ovárica, en este momento se observó con claridad el estroma ovárico. En la quinta etapa, cuando las gonias proliferaron alrededor de toda o casi toda la cavidad ovárica, dando inició el desarrollo de las lamelas ováricas, las cuales son elongaciones del tejido germinal hacia el centro de la cavidad ovárica. A partir de ese momento en el ovario se observaron todos los tejidos característicos de este órgano: el epitelio germinal, las lamelas ováricas, el estroma y la túnica albugínea. A partir de este estado de desarrollo, los cambios en el ovario consistieron en el cambio de su tamaño, por lo que el epitelio germinal y el número de ovogonias aumentó, la túnica albugínea disminuyó su espesor, las lamelas ováricas y el estroma crecieron y la gónada aumentó de diámetro. A la par del cambio de tamaño de los tejidos que componen el ovario, se observaron ovocitos primarios y folículos, los cuales aumentaron en número en los ovarios de los organismos que tenían una mayor longitud. (Figura 32)

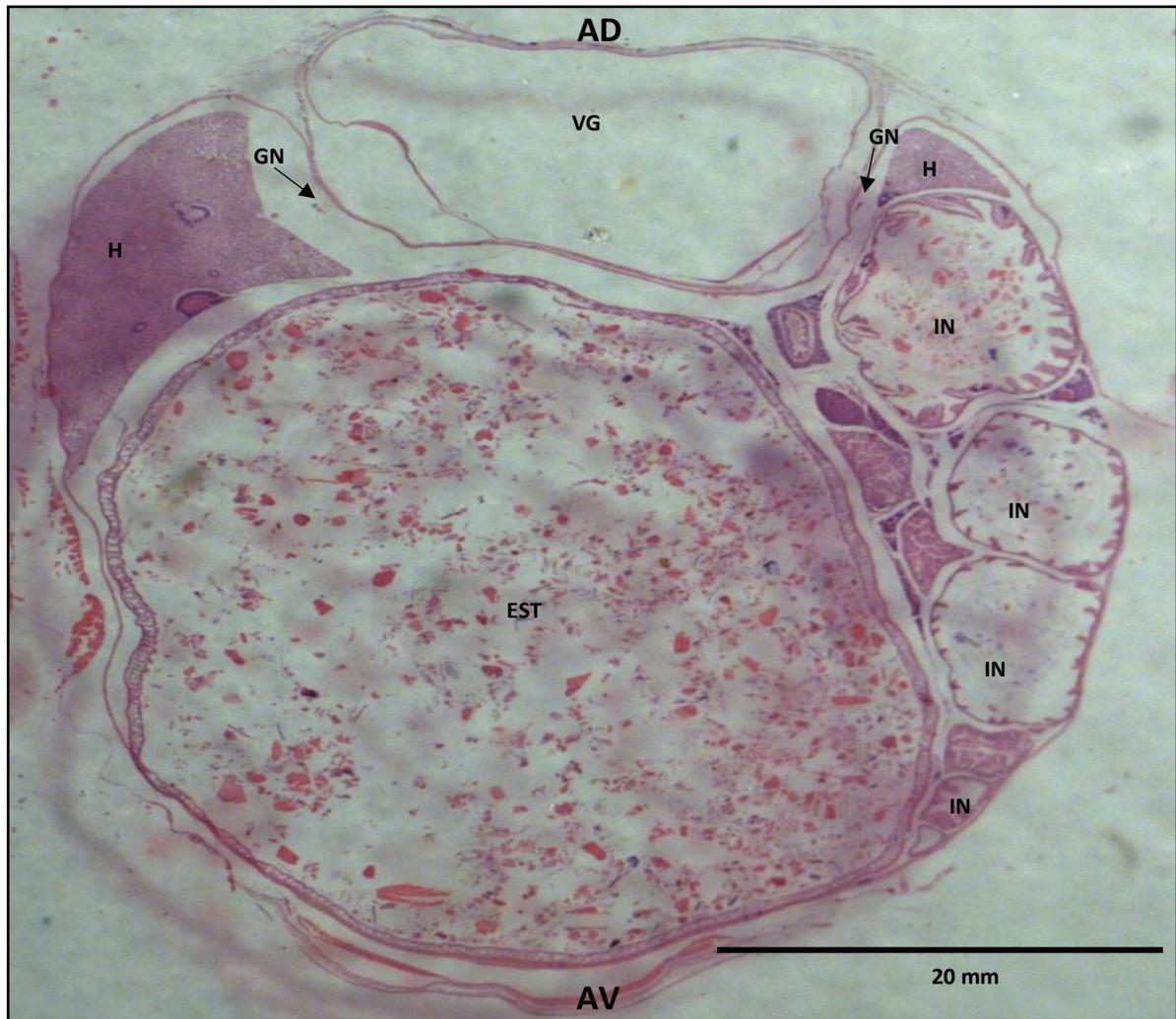


Figura 31. Corte transversal de la cavidad abdominal de *Totoaba macdonaldi*. AD, Área dorsal del organismo; AV, Área ventral del organismo; VG, Vejiga gaseosa; GN, Gónada; H, Hígado; EST, Estomago; IN, Intestino.

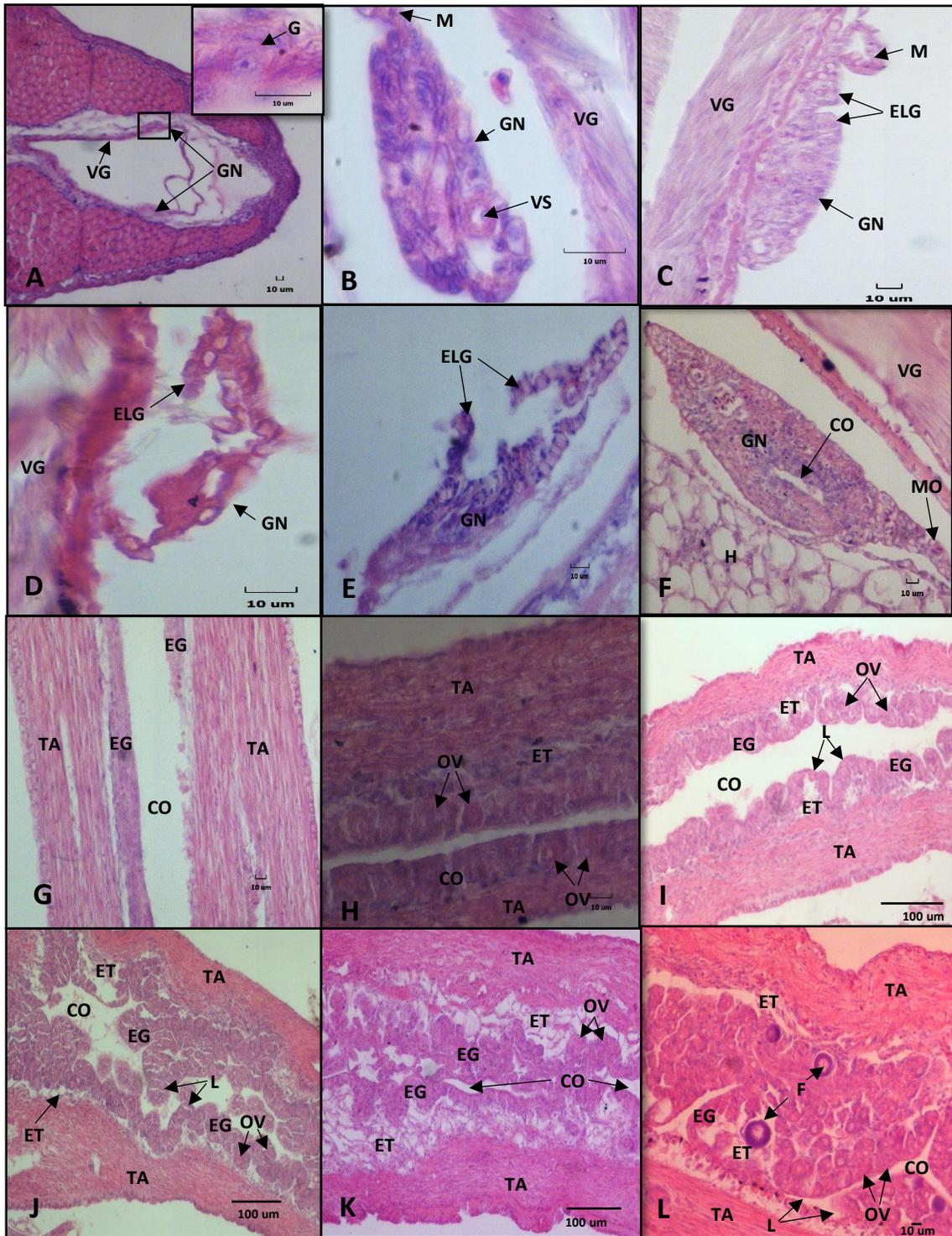


Figura 32. Génesis del ovario de *Totoaba macdonaldi*. A, Corte transversal del organismo (LT=1.9 cm); B, Corte transversal de gónada (LT=4.1cm); C, Corte transversal de gónada (LT=6.7cm); D, Corte transversal de gónada (LT=6cm); E, Corte transversal de ovario (LT=10.5 cm); F, Corte transversal del ovario (10.4 cm); G, Corte longitudinal del ovario (LT=13cm); H, Corte longitudinal del ovario (LT=14cm); I, Corte longitudinal del ovario (LT=23.5cm); J, Corte longitudinal del ovario (LT=18cm); K, Corte longitudinal del ovario (LT=27cm); L, Corte longitudinal del ovario (LT=28cm); LT, Longitud total del organismo; CO, Cavidad ovárica; OV, Ovogonia; TA, Túnica albugínea; ET, Estroma; EG, Epitelio germinal; L, Lamelas o crestas ováricas; F, Folículo; OP, Ovocito primario; VG, Vejiga gaseosa; GN, Gónada; H, Hígado; ELG, Elongación de la gónada y VS, Vaso sanguíneo.

3.3.3 Génesis testicular

Para facilitar la descripción de la génesis testicular, su desarrollo se dividió en etapas tomando en cuenta la aparición o crecimiento de los tejidos característicos de la gónada. En la primera etapa se observó, la presencia de células germinales en la periferia de la gónada (primera evidencia que indica que la gónada se va a desarrollar en un testículo), la cual tenía una cavidad central, similar a la que se observa en un ovario. En la segunda etapa se observó la formación dispersa de lóbulos en algunas zonas de la periferia de la gónada. En la tercera etapa se observó la formación de lóbulos continuos solo en la mitad del perímetro de la gónada, al mismo tiempo comenzó la degradación de la cavidad y restructuración continua del tejido central de la gónada. En la cuarta etapa se observó una mayor proliferación de espermatogonias y la presencia de lóbulos, dispuestos radialmente desde toda la periferia hacia la región central del testículo. A la par de este evento continuó la reducción del diámetro de la cavidad hasta que fue llenada totalmente por el tejido central de la gónada. A partir de la ausencia de la cavidad en el centro de la gónada, en los testículos de los organismos muestreados, solo se observó el aumento de la longitud de los lóbulos y del diámetro de los testículos, también se incrementó el número de espermatogonias y la presencia de cistos con espermatocitos o espermátidas (Figura 33).

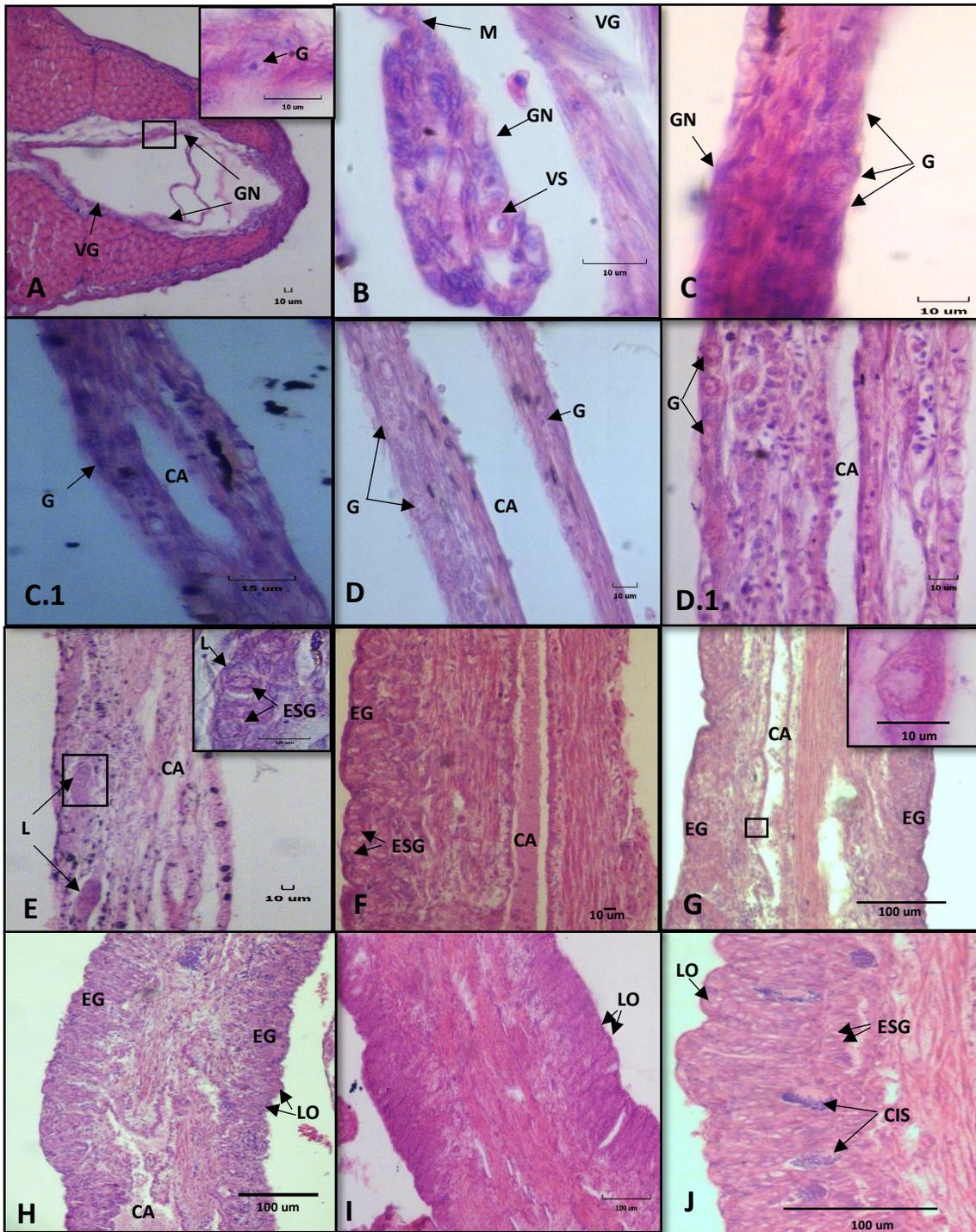


Figura 33. Génesis testicular de *Totoaba macdonaldi*. A, Corte transversal de totoaba (LT=1.9 cm); B): Corte transversal de la gónada (LT=4.1cm); C y C.1, Corte longitudinal de la gónada (LT=8.4cm); D y D.1, Corte longitudinal de la gónada (LT=15cm); E, Corte longitudinal de la gónada (LT=15cm); F, Corte longitudinal de la gónada (LT=21cm); G, Corte longitudinal de la gónada (LT=23.5 cm); I, Corte longitudinal de la gónada (LT=27.5 cm); J, Corte longitudinal de la gónada (LT=29cm); LT, Longitud total del organismo; GN, Gónada; VG, Vejiga gaseosa; M, Mesenterio; VS, Vaso sanguíneo; EG, Epitelio germinal; LO, Lóbulo; CIS, Cisto; CA, Cavidad y ESG, Espermatogonia.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Exposición a diferentes temperaturas (18, 22, 26 y 30°C) durante el periodo de 24 a 120 DDE.

4.1.1 Sobrevivencia

La mortalidad durante el periodo de exposición a las temperaturas experimentales se debió a diversas causas. En el tratamiento de 18 °C la principal causa de muerte fue la baja temperatura a la que fueron expuestas las larvas, debido a que los peces son poiquiloterms, es decir que su temperatura interna varía de acuerdo con la temperatura del agua (Fanjul, 2008; Robaina y Schuchardt, 2009), esta tiene un efecto sobre el metabolismo de los organismos, ya que afecta la velocidad de las reacciones enzimáticas y la relación enzima-sustrato (Hochachka y Somero, 1971).

Se conocen dos estudios relacionados con el periodo de reproducción de la totoaba en la desembocadura del Río Colorado en el Golfo de California (Nakashima, 1916; López y Coronel, 2016). La temporada reproductiva de la totoaba abarca de finales de febrero a junio (Nakashima, 1916) o de abril a junio (López y Coronel, 2016). En ninguno de los estudios anteriores se menciona la temperatura del agua. La temperatura promedio en el alto Golfo de California varía de 15 a 31°C entre invierno y verano; sin embargo, en años cálidos la temperatura invernal es de 19 ± 0.75 °C (Ramírez-León et al., 2015). Probablemente la discrepancia entre diferentes autores sobre la época reproductiva de la totoaba se deba a que podría variar dependiendo de la temperatura del agua, ya que se sabe que los organismos se reproducen cuando las condiciones ambientales son las más favorables para la supervivencia de sus crías (Carrillo et al., 2009). En condiciones de laboratorio se ha observado que las totobas empiezan a reproducirse cuando el agua alcanza los 20°C (*com. pers.* Barón- Sevilla, 2019) y dicha temperatura es un poco mayor que la temperatura de experimentación, por tal motivo es probable que varias larvas se murieran al estar expuestas a la temperatura de 18°C.

En condiciones de laboratorio, las totoabas de dos meses de edad (60 DDE) prefirieron temperaturas de 24.6 a 27 °C (Talamás-Rohana, 2001). La diferencia de 7.8°C entre la temperatura experimental de 18°C en este trabajo y el promedio de las temperaturas preferidas por la totoaba, probablemente provocó la muerte de los organismos. Además de la mortalidad por la baja temperatura, también se presentó mortalidad por canibalismo, el cual aumento en los tratamientos de mayor temperatura, ya que la temperatura favoreció la diversidad de tallas en los organismos. El canibalismo es una conducta común en la totoaba, que también se ha observado en otras especies de peces marinos en condiciones de cultivo

como la curvina *Argyrosomus regius* (Estevez, 2018), el Jurel *Seriola rivoliana* (Burgoin-Cota, 2015) y el pargo flamenco *Lutjanus guttatus* (Abdo-de la Parra et al., 2015). En las tres especies anteriormente mencionadas se observó que la dispersión de tallas aumentaba la conducta caníbal en los organismos, posiblemente como una condición normal derivada de sus hábitos alimenticios, que se intensifica como resultado de la densidad de los cultivos.

En el tratamiento de 30°C la principal causa de muerte fue la alta densidad ya que a esta temperatura los organismos crecieron más que en los otros tratamientos. El mayor tamaño de los organismos se debió a que a 30°C se incrementó la actividad metabólica (Randall et al., 2002; Alfaro et al., 2005). Otro efecto de la alta densidad a 30°C fue el incremento en la demanda de oxígeno y en la excreción de amoníaco y CO₂, por esta razón cualquier falla en el control de los factores físico-químicos, podía provocar la muerte de los organismos. Además, debe tomarse en cuenta que en una de las réplicas de este tratamiento una de las mangueras de aireación se desconectó, por lo que una falla momentánea en el suministro de oxígeno ocasionó su reducción drástica y produjo la mortalidad por asfixia. En el caso de la réplica 2 se registró un aumento de 2°C temperatura, lo cual aceleró aún más la tasa metabólica de los organismos, que provocó un mayor consumo de oxígeno y mayor excreción de amoníaco y CO₂, y probablemente los organismos murieron debido a la baja disponibilidad de oxígeno y la elevada concentración de amoníaco y CO₂ en el agua.

En los tratamientos de 22 y 26°C la principal causa de muerte de los organismos se debió al canibalismo. A pesar de que en los tratamientos de 22 y 26°C la causa probable de muerte de los organismos fue la misma en el tratamiento de 22°C se encontró una mayor sobrevivencia que en el tratamiento de 26°C. Esto se debió posiblemente a que en los organismos expuestos a temperaturas más elevadas de 26 y 30°C había una mayor diversidad de tallas que en los expuestos a temperaturas bajas (18 y 22°C), lo cual favoreció el canibalismo de los organismos más grandes hacia los más pequeños. En el cultivo de peces planos también se ha observado que la diversidad de tallas favorece el canibalismo (Sarasquete et al., 1999). Otros factores que favorecen el canibalismo son la densidad y la disponibilidad de alimento (Folkvord, 1997). La densidad de peces era mayor en el tratamiento de 26°C que en el tratamiento de 22 °C, probablemente la menor sobrevivencia de peces en el tratamiento de 26°C también se pudo deber a este factor. Respecto a la disponibilidad de alimento, en ambos tratamientos (22 y 26°C), los organismos se alimentaban tres veces al día a saciedad aparente, y en condiciones de cultivo esta técnica de alimentación disminuye la conducta de canibalismo (Hecht y Pienaar, 1993). Por lo tanto, este último factor, no se consideró como la principal causa de la diferencia en el canibalismo entre los tratamientos de 22 y 26°C.

4.1.2 Crecimiento

Al final de la etapa de exposición a diferentes temperaturas los organismos tenían 120 DDE, sin embargo, a pesar de tener la misma edad y de provenir de un mismo desove, se observaron diferencias significativas en la longitud corporal. Los peces expuestos a temperaturas bajas alcanzaron tallas más pequeñas mientras que los más grandes se observaron en las temperaturas más altas (26 y 30°C). Se sabe que en el desarrollo de los organismos influyen factores abióticos como la temperatura, pH, salinidad, fotoperiodo y oxígeno y factores bióticos como la densidad de la población, disponibilidad de alimento, hormonas, etc. (Johnston et al., 1996). De estos factores la temperatura es uno de los que más influye en la reproducción, desarrollo y crecimiento de los organismos. La mayoría de los procesos celulares, incluido el crecimiento dependen del funcionamiento adecuado de las proteínas y membranas (Kingsolver, 2009). Las temperaturas bajas estabilizan los enlaces químicos débiles, disminuyen la fluidez de las membranas lo que afecta la permeabilidad de estas, y reducen la flexibilidad de las proteínas lo que reduce la capacidad de las enzimas para unirse al sustrato provocando que las reacciones enzimáticas sean más lentas, y como consecuencia de la disminución en la velocidad de las reacciones enzimáticas se reduce la tasa de crecimiento en los organismos. Las temperaturas altas aumentan la fluidez de las membranas y la flexibilidad de las proteínas, lo que acelera la capacidad de las enzimas para unirse al sustrato y provoca que las reacciones sean más rápidas. Todo ello contribuye a aumentar la tasa de crecimiento de los organismos, sin embargo, en el momento que la temperatura es demasiado elevada, también puede afectar negativamente el funcionamiento de la enzima o la desnaturaliza, disminuyendo la velocidad de las reacciones rápidamente e incluso pueden detenerse (Currie y Shulte, 2014), y provocar la muerte de los organismos. Además de la temperatura, la densidad también pudo influir, ya que puede generar un ambiente de estrés (Wedemeyer, 1997), debido a que hay más competencia por alimento y por espacio, lo cual impide que la energía en lugar de destinarse al crecimiento, se utilice en procesos de compensación del estrés, además, cuando las densidades son bajas, la actividad de los organismos es menor, lo cual permite que la energía que no se utiliza en la natación, esté disponible para el crecimiento (Treasurer et al., 2011).

A pesar de que de la densidad de cultivo pudo afectar el crecimiento de la totoaba en los diferentes tratamientos, cabe señalar que a pesar de que en el tratamiento de 18°C había menor densidad que en el tratamiento de 22°C, la longitud de los organismos expuestos al tratamiento de 22°C fue mayor y entre los organismos expuestos a 22 y 26°C no se encontraron diferencias estadísticas en la densidad, sin embargo los organismos del tratamiento de 26°C eran más grandes. Lo anterior indica que la densidad no fue el

único factor que produjo las diferencias de crecimiento, si no que la temperatura fue el factor principal que propició las diferencias de tamaño de los organismos en los diferentes tratamientos.

4.1.3 Diferencias en el desarrollo de la gónada

El estado de desarrollo de la gónada empezó a diferenciarse a partir de los 72 DDE en algunos de los tratamientos experimentales. Los organismos expuestos a 18 y 22°C, tenían las gónadas indiferenciadas a los 72 y 102 DDE, mientras que en los organismos de la misma edad, pero expuestos a 26 y 30°C las gónadas ya estaban diferenciadas. Este patrón de desarrollo de las gónadas concuerda con lo observado en otras especies como en los aterinidos sudamericanos *Odontesthes argentinensis* y *Patagonina hatcheri* expuestos a 18, 21 y 25°C, donde también los organismos expuestos a temperaturas más elevadas se diferenciaron a una edad más temprana, sin embargo, todos se diferenciaron en un intervalo de talla común, dependiendo del sexo y la especie (Strüssmann et al., 1996). La diferenciación sexual en un intervalo de tallas similar, también se observó en el presente estudio, las hembras y machos de totaba se diferenciaron cuando alcanzaron tallas de entre 13 y 15 cm y 15 y 17 cm respectivamente. La formación de la cavidad ovárica se observó en organismos con longitudes de 6 a 10 cm. En el presente estudio no se consideró la presencia de la cavidad ovárica como un indicador del desarrollo del ovario, debido a que en muchas especies de teleósteos la presencia de esta cavidad no indica que la gónada se vaya a desarrollar en un ovario, debido a que puede haber procesos apoptóticos del tejido germinal asociado a esta cavidad de la gónada, para dar paso al desarrollo de un testículo (Nakamura et al., 1998). En el presente estudio se consideraron varias características de la gónada para clasificarla como ovario o testículo. Se consideró un ovario cuando se observó al epitelio germinal bordeando la cavidad ovárica, túnica albugínea y el estroma dispuesto entre el epitelio germinal y la túnica albugínea. En contraste, se consideró un testículo cuando en la gónada se observó el epitelio germinal o los lóbulos seminíferos en la periferia de la gónada, asociados con la túnica albugínea y ausentes en el borde de la cavidad de la gónada.

En varias especies de peces se ha comprobado que la madurez de la gónada está más relacionada con la longitud que con la edad de los organismos (FAO, 1975). En el pargo de manglar (*Lutjanus argentimaculatus*) (Russell y McDougall, 2008), el pez gallo (*Callorhynchus callorhynchus*) (Bernasconi et al., 2015) y en el salmonete gris (*Liza macrolepis*) (Mohammadi et al., 2015), se ha confirmado esta relación a través del estudio de la longitud a la que el 50% de los organismos alcanza la madurez sexual (LM_{50}) y por el contrario, la edad de la primera madurez tiene una mayor variación. A pesar de que en el presente

trabajo, las totoabas están lejos de llegar a la longitud de primera madurez, los anteriores estudios destacan la importancia de tomar en cuenta la longitud y no la edad de los organismos para describir el estado del desarrollo de la gónada.

4.2 Exposición de *Totoaba macdonaldi* a una temperatura común de los 120 a los 213 DDE

4.2.1 Proporción de sexos por tratamiento

En el tratamiento de 18°C se encontró una mayor proporción de hembras que de machos y en los tratamientos de 22, 26 y 30°C una mayor proporción de machos que de hembras, pero estas diferencias no se validaron estadísticamente, por lo que la temperatura no parece tener una influencia sobre la proporción de sexos. Sin embargo, en algunos organismos expuestos a 18°C las gónadas estaban indiferenciadas a los 120 DDE, (fin de la exposición al tratamiento térmico), lo cual indica que la tasa de crecimiento/desarrollo de estos organismos era menor respecto a la tasa de crecimiento de los organismos expuestos a temperaturas elevadas, por lo que para que se observara si había o no un efecto de esta temperatura sobre la determinación del sexo, los organismos debieron permanecer un mayor tiempo a esa temperatura, quizás hasta alcanzar una longitud similar a la de los organismos cultivados a una temperatura mayor. Atendiendo lo que se conoce hasta el momento sobre la determinación sexual por temperatura, el efecto de esta variable está ligado a un lapso particular del periodo de desarrollo, en el cual el pez es sensible para la diferenciación sexual (Piferrer, 2009). Es posible, que el retraso en el desarrollo no propiciara que el periodo de exposición térmica coincidiera con el periodo sensible o que el periodo sensible este más relacionado con el grado de desarrollo/crecimiento que con la edad. En este periodo, cuando la gónada esta indiferenciada, la proporción de esteroides sexuales, de testosterona y estradiol, influyen en la diferenciación de la gónada hacia un ovario o un testículo (Navara, 2018; Navarro-Martín et al., 2011). La temperatura puede influir en la determinación sexual al modificar la concentración de testosterona y estradiol en las gónadas. Se han documentado tres posibles causas por la cuales la temperatura puede determinar el sexo. 1) La temperatura afecta la actividad de la enzima citocromo P450 aromatasa la cual es la encargada de transformar la testosterona a estradiol (González y Piferrer, 2002). La eficiencia máxima de la enzima se encuentra dentro de un intervalo de temperatura el cual es específico para cada especie. Si la temperatura esta fuera del intervalo óptimo en el que funciona la enzima, entonces la transformación de testosterona a estradiol disminuye, aumentando la testosterona en las gónadas y se diferencia en un testículo; 2) La temperatura incide sobre el gen *cyp19a1a*, que codifica para la enzima

citocromo P450 aromatasa, ya que puede promover la metilación o desmetilación del gen a edades o tallas en las que ocurre la diferenciación de la gónada (Kitano et al., 2000; Guiguen et al., 2009; Navarro-Martín et al., 2011), lo que trae como consecuencia que el gen *cyp19a1a* no se exprese y al no haber suficiente enzima que transforme la testosterona a estradiol, hay un aumento de testosterona en las gónadas y estas se diferencian en un testículo en lugar de diferenciarse en un ovario; y 3) Las temperaturas extremas pueden estresar a los organismos, y en condiciones de estrés hay un aumento de cortisol en la sangre (Auró y Ocampo, 1999), el cual en algunas especies se ha encontrado que puede influir en la determinación del sexo de los organismos (Navara, 2018). Como en totoaba no se encontró influencia de la temperatura (18, 22, 26 y 30°C) sobre la proporción sexual en organismos expuestos de los 27 a los 120 DDE, probablemente ninguno de los mecanismos anteriormente mencionados donde la temperatura determina el sexo influyo en la totoaba. Para encontrar el mecanismo que determina el sexo en la totoaba se tendrían que realizar estudios con marcadores moleculares para identificar si tiene GSD o comenzar la exposición a diferentes temperaturas en larvas recién eclosionadas para ampliar el periodo de exposición, ya que probablemente en el presente trabajo no se encontró influencia de la temperatura porque posiblemente el periodo de exposición a los tratamientos de temperatura se inició a edades tardías.

Al considerar el promedio de las tres réplicas del tratamiento de 26°C, se encontró una mayor proporción de machos que de hembras, sin embargo, la proporción entre réplicas fue muy contrastante, ya que en dos de ellas se encontró una mayor proporción de hembras y en la otra mayor proporción de machos. Es probable que esta variación se deba a una condición de estrés generada por una baja concentración de oxígeno o por los altos niveles de NAT en una de las réplicas de ese tratamiento. El estrés puede ser uno de los factores ambientales que influyen en la diferenciación sexual en los organismos que tienen determinación ambiental o determinación genética con influencia térmica (Boroiller y D´Cotta, 2016). En los peces se ha encontrado que en respuesta a un agente estresor (e.g. temperatura, hipoxia, o concentraciones elevadas de NAT), se produce un aumento en la concentración de cortisol, el cual influye en la determinación del sexo de algunas especies como el pejerrey (*Odontesthes bonariensis*), el pez mosquito (*Gambusia affinis*) y el lenguado del sur (*Paralichthys lethostigma*) (Hattori et al., 2009; Knapp et al., 2010; Mankiewicz et al., 2013). Los mecanismos por los cuales el cortisol regula la determinación del sexo no son bien conocidos hasta el momento (Goikoetxea et al., 2017); sin embargo, existen tres vías por las cuales el cortisol puede intervenir en la diferenciación del sexo: 1) Inhibe la expresión del gen *cyp19a1a* que codifica para la enzima citocromo P450 aromatasa, y al no haber suficiente enzima que transforme la testosterona en estradiol, hay un aumento de testosterona en las gónadas y estas terminan diferenciándose en un testículo en lugar de diferenciarse en un ovario; 2) Estimula la producción de 11-Cetotestosterona (11-KT) en los peces, la cual junto con la testosterona, y los andrógenos 11β-

hidroxiandrostenediona y 11 β -hidroxitestosterona (11 β -hidroxi-T) son los encargados de diferenciar la gónada en un testículo (Piferrer et al., 1993). Además, al igual que el estradiol, la 11- Cetotestosterona se sintetiza a partir de la testosterona, y al haber un requerimiento de testosterona para la síntesis de 11-KT, disminuye la cantidad de testosterona disponible para transformarse en estradiol, por lo tanto los niveles de estradiol disminuyen en las gónadas, y estas son transformadas en un testículo en lugar de ser transformadas en un ovario; y 3) estimula la producción de la hormona antimülleriana (AMH) la cual inhibe la proliferación de las células germinales e induce su apoptosis (Navara, 2018; Goikoetxea et al., 2017), propiciando el desarrollo de un testículo. En varias especies de peces, como en la medaka *Oryzias latipes*. (Kobayashi, et al., 2004) y tilapia *Oreochromis niloticus* (Kobayashi et al., 2008), el número de células germinales en la gónada indiferenciada es un indicador de la definición sexual. La proliferación de células germinales ocurre primero en el ovario que en el testículo, por lo tanto el número de células germinales es mayor en una gónada que se va a diferenciar en un ovario (Hamaguchi, 1982; Kobayashi, et al., 2004; Pandian, 2012). Si hay apoptosis de células germinales en la gónada indiferenciada, se reduce su número y la gónada termina diferenciándose en un testículo en lugar de diferenciarse en un ovario.

De los tres mecanismos en los que influye el cortisol en la determinación del sexo probablemente en la réplica del tratamiento de 26° en la que hubo más machos, el cortisol inhibió la expresión del gen *cyp19a1a* o estimuló la producción de 11- Cetotestosterona lo que posiblemente ocasionó que la mayoría de los organismos de esa replica se diferenciaron en machos. El mecanismo en el que existe masculinización de los organismos porque el cortisol estimula la producción de la AMH probablemente no haya influido en el presente trabajo, ya que los niveles bajos de oxígeno y valores elevados de NAT se presentaron a partir de los 80 DDE y la proliferación de las células germinales (cuya proliferación indica que la gónada se desarrollara en un ovario) se da a edades muy tempranas cuando la gónada todavía esta indiferenciada (Pandian, 2012; Hamaguchi, 1982; Kobayashi, et al., 2004) y para los 72 DDE en las muestras histológicas de dicho tratamiento ya se podía identificar el sexo de los organismos.

4.2.2 Tamaño entre hembras y machos por tratamiento

Las hembras de *Totoaba macdonaldi* son más grandes que los machos en la etapa adulta (Arvizu y Chávez, 1972; Nakashima, 1916); sin embargo, en el presente estudio no se encontraron diferencias significativas entre la longitud de las hembras y los machos de cada tratamiento a los 213 DDE (7 meses). En los peces, el hecho de que un sexo crezca más, tiene un beneficio implícito; en las hembras, incrementa su

desempeño biológico, ya que al ser de mayor tamaño, tienen una mayor fecundidad; en los machos, incrementa su competencia sexual, lo que les permite aparearse con un mayor número de hembras, lo que también incrementa su desempeño biológico (Barneche et al., 2018). La diferencia de tamaño entre sexos, como estrategia reproductiva se debe a diversas causas dependiendo de la especie. por ejemplo, en la tilapia y la platija del mar del norte el ritmo de crecimiento entre hembras y machos es diferente lo que hace que un sexo sea más grande que otro (FAO, 1975). En el pejerrey del atlántico (*Menidia menidia*), los juveniles que se mantienen en condiciones de laboratorio no presentan diferencias de tamaño entre las hembras y machos. En contraste, en el pejerrey en el medio natural sí se observa una diferencia de tamaño entre los sexos y la razón es que poseen un sistema de determinación sexual por temperatura, de tal forma que la mayoría de los organismos que nacen durante el inicio de la temporada reproductiva cuya temperatura varía entre 11 y 19 °C se diferencian en hembras y los que nacen al final de la temporada, con una temperatura mayor, entre 17 y 25 °C, se diferencian en machos. De esta forma, en la época reproductiva, las hembras son de mayor tamaño, ya que eclosionaron unos meses antes y tuvieron más tiempo para crecer (Conover, 1984). En el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) los machos son más grandes que las hembras, debido a que los machos alcanzan la primera madurez después que las hembras, aproximadamente a los tres y dos años respectivamente (Taranger et al., 2010). Cuando un organismo alcanza la madurez sexual, la tasa de crecimiento disminuye debido a que la energía se distribuye de manera diferente. La energía del alimento se utiliza en varios procesos en el organismo, una parte se pierde como energía fecal y energía excretada (generalmente como amoniaco), la fracción utilizable o energía neta, se divide en energía de mantenimiento, utilizada en procesos como respiración, regulación iónica, circulación, etc., y en energía de retención, utilizada para crecimiento somático o para el crecimiento de la gónada en la fase de reproducción (Lucas, 2002; Jover, 2009). Cuando en una especie uno de los sexos madura sexualmente primero, la energía de retención, antes utilizada para el crecimiento, ahora es destinada principalmente a la reproducción, mientras que en el sexo que aún no madura sexualmente, esa energía se sigue utilizando principalmente en el crecimiento, es por ese motivo que el sexo que madura más tarde es de mayor tamaño.

En el presente estudio, juveniles de totoaba cultivados en condiciones de laboratorio no presentaron diferencias de tamaño entre sexos. En condiciones de laboratorio, algunas totoabas alcanzan la madurez sexual a los 3 años de edad, pero tampoco existen diferencias de tamaño entre los sexos (*com. pers.* Barón-Sevilla, 2019), sin embargo, en el medio natural se ha observado que las hembras son de mayor tamaño que los machos (Nakashima, 1916; Arvizu y Chávez, 1972). El patrón de crecimiento observado y reportado para totoaba es similar al observado para el pejerrey (*M. menida*), ya que en condiciones de laboratorio no se presentaron diferencias de tamaño entre sexos, pero en el medio natural sí. Sin embargo, de acuerdo

con los resultados de la exposición a diferentes temperaturas (18, 22, 26 y 30°C), la totoaba no tiene determinación sexual por temperatura como ocurre en *M. menidia*. Por lo tanto, el mecanismo que opera sobre la diferencia de tamaño en totoaba tanto en condiciones de laboratorio o en el medio natural probablemente no sea el mismo que en *M. menidia*. La diferencia de tamaño en totoaba probablemente se produzca por un proceso similar al del salmón *S. salar* (Taranger et al., 2010), que depende del momento en el que alcanzan la madurez sexual, que es diferente entre sexos. En el medio natural los machos alcanzan la primera madurez sexual a los cuatro años mientras que las hembras un poco más tarde (Nakashima, 1916). Por lo tanto, la energía disponible para crecimiento es mayor en las hembras que en los machos, por lo menos hasta el momento en que las hembras alcanzan la primera madurez. Respecto a las condiciones de laboratorio en las que se cultivan las totoabas, donde la disponibilidad de alimento es abundante y continua, algunos machos y hembras, posiblemente los más grandes, alcanzan la madurez sexual alrededor de los tres años y no hay diferencia de tallas (*com. pers.* Barón-Sevilla, 2018). El proceso que conduce a una madurez precoz en estas totoabas que fueron seleccionadas como reproductores, es probable que sea similar al que ocurre en otras especies, como en el bacalao noruego, que en condiciones de laboratorio, la talla y la edad a la que alcanzan la primera madurez suele disminuir respecto a las de los organismos silvestres (Svåsand et al., 1996). Esto se debe a que en los laboratorios de cultivo se tienen regímenes de alimentación mejorados, respecto a los regímenes de alimentación de los organismos silvestres, donde la alimentación depende de la disponibilidad de alimento en el medio y la capacidad de atraparlo, por esta razón, los organismos que se mantienen en cautiverio pueden acumular mayores reservas energéticas, que finalmente se destinan a la reproducción (Taranger et al., 2010).

4.2.3 Niveles de esteroides en sangre

El análisis de esteroides sexuales en las totoabas de 213 DDE no reveló diferencias significativas en los niveles de estradiol y testosterona en sangre, por tal motivo no se pudo relacionar el perfil hormonal con el sexo previamente identificado con el análisis histológico. La similitud en los niveles de estradiol de las hembras y los machos probablemente se debió a que el estradiol es el estrógeno más abundante en ambos sexos. En las hembras está involucrado en procesos de diferenciación y proliferación de las ovogonias y en las etapas pre y pos puberales en la síntesis de la vitelogenina en los hepatocitos (Young et al., 2005; Norris y López, 2011). En los machos, el estradiol está involucrado en los procesos de proliferación mitótica de las espermatogonias (Young et al., 2005). En las muestras histológicas de las gónadas de hembras y machos se observaron gonias en división, por lo que es posible que los niveles de estradiol encontrados en el

plasma de los machos se deban a que en las gónadas se estaban llevando a cabo procesos de proliferación de las gonias.

De manera similar, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de testosterona en la sangre, posiblemente por que, del grupo de los andrógenos, la 11-ketotestosterona es el más abundante en los machos y la testosterona el más abundante en hembras. En los machos, los andrógenos tienen como función la diferenciación gonadal y sexual, la regulación de la espermatogénesis, y la activación del comportamiento sexual, como la agresividad y la construcción de nidos. En las hembras, la testosterona también está involucrada en aspectos del comportamiento agresivo y construcción de nidos (Norris y López, 2011); sin embargo, las hembras de totoaba no presentan comportamientos agresivos ni actividades relacionadas con la construcción de nidos, ya que son desovadores pelágicos promiscuos (*com. pers.* Barón-Sevilla, 2019), además la construcción de nidos se da durante la etapa reproductiva, y en las totoabas, la edad reproductiva inicia partir de los tres años en condiciones de laboratorio y en su hábitat natural a partir de los cuatro años en los machos y a una edad mayor en las hembras (Nakashima, 1916; *com. pers.* Barón-Sevilla, 2019). Los organismos utilizados en este estudio para la cuantificación de esteroides solo tenían siete meses de edad, por lo cual no presentaron los comportamientos típicos de la etapa reproductiva, como cambios de coloración, cambios en los patrones de nado y producción de sonido característico de los machos (True, 2012).

En las hembras del pez gato (*Heteropneustes fossilis*), en el gobio (*Gobio gobio*) y la carpa común (*Cyprinus carpio*), se han encontrado variaciones en las concentraciones plasmáticas de testosterona, dependiendo de la época del año y la etapa reproductiva (Lamba et al., 1983; Rinchard et al., 1993; Taghizadeh et al., 2013). De acuerdo con Rinchard et al., (1993) la testosterona detectada en las hembras se debe a que este andrógeno es el precursor del 17- β estradiol en las gónadas. En las hembras de pez gato se encontró que cuando disminuía la concentración de estradiol, había un aumento en la concentración de testosterona, lo cual indica que existe una relación precursor-producto entre estos esteroides (Lamba et al., 1983). Aunque en el presente estudio no se analizó la variación de la concentración de testosterona y estradiol de las hembras en función del tiempo, la concentración de testosterona que se encontró en las hembras probablemente se deba a la relación precursor-producto que existe entre la testosterona y el 17- β estradiol en el ovario.

4.2.4 Diámetro de gonias y génesis gonadal

4.2.4.1 Diámetro de gonias

El diámetro de las gonias en *Totoaba macdonadi* fue de 10-13 μm ; sin embargo, en la mayoría de los organismos, tanto en las hembras (ovogonias) como en machos (espermatogonias) el diámetro fue de 10-12 μm , solo en algunas hembras se encontraron ovogonias con diámetros de 13 μm . Probablemente la presencia de ovogonias de mayor tamaño en hembras, se deba a que se midieron algunas células que estaban por empezar un proceso de división celular y tenían un tamaño mayor que aquellas que se encontraban en una etapa posterior a la mitosis. Sin embargo, el análisis no permitió diferenciarlas del resto de las gonias, ya que no tenían los cromosomas condensados, característicos de la mitosis. Es probable que otra de las causas por las cuales se encontraron gonias de mayor tamaño en las hembras, sea porque se midieron células en estado de ovocito primario y no de ovogonia ya que en algunos casos no fue posible identificar la etapa de migración de estas células al estroma ni se observó la cubierta de células de la granulosa que los caracteriza (Zanuy et al., 2009).

Las células germinales tienen un diámetro entre 10-20 μm según la especie (Yön y Akbulut, 2015; Koc y Yüce, 2012). El diámetro de las gonias encontradas en la totoaba están dentro de ese intervalo; sin embargo, para los peces óseos se ha reportado que el diámetro de las espermatogonias tipo A, es de 12 a 16 μm y para las espermatogonias tipo B de 9-12 μm (Uribe et al., 2014). El diámetro de las espermatogonias en la totoaba está dentro del diámetro de las espermatogonias tipo B y cabe señalar que en el presente estudio no se diferenciaron las espermatogonias de tipo A y B, debido a que la principal diferencia entre estos estadios celulares, es que las del tipo B tienen puentes citoplasmáticos entre sus clonas, y estos puentes no son fáciles de identificar con histología convencional y microscopía de luz.

Otro aspecto que pudo influir en la cuantificación del diámetro de las gonias, es que en el presente trabajo, las medidas se hicieron en muestras histológicas, las cuales pasan por procesos de deshidratación y rehidratación, y estos procesos pueden ocasionar una variación en el diámetro que presentan normalmente las células; sin embargo, para las ovogonias de *Totoaba macdonaldi* medidas en cortes histológicos se reporta un diámetro de 17 a 20 μm (De Anda-Montañez, 2013). En contraste, en el presente trabajo a pesar de que también se midió el diámetro en muestras histológicas, los diámetros encontrados en las ovogonias (10-13 μm) son menores.

4.2.4.2 Génesis gonadal

El ovario de la totoaba se caracteriza por la cavidad ovárica en la parte medular de la gónada, un epitelio germinal que bordea la cavidad ovárica, y que dependiendo del grado de desarrollo del órgano, se pliega formando lamelas ováricas, en seguida y hacia la periferia del ovario se distingue el estroma ovárico y externamente, cubriendo al ovario está la túnica albugínea. Por el contrario, los testículos de la totoaba se caracterizan por poseer el tejido germinal en la periferia de la gónada, que se dispone desde la túnica albugínea hacia la región central del órgano formando lóbulos y hacia el centro del órgano se observan los conductos deferentes.

Las características del ovario de la totoaba observadas en el presente trabajo concuerdan con la descripción hecha por Paredes (2018) para esta especie. Sin embargo, en relación con las características del testículo de totoaba, no se encontró información en otros trabajos sobre la estructura de los tejidos que lo conforman.

A continuación, se propone un modelo del desarrollo de las gónadas de la totoaba elaborado a partir de ejemplares de diferentes longitudes y grados de desarrollo y que se ilustran de forma gráfica en la figura 34. En las totoabas menores de 6 cm de longitud total, las gónadas se encontraban indiferenciadas, se caracterizaban por ser alargadas y delgadas, poseían uno o dos vasos sanguíneos en la parte ventral contraria al mesenterio que sostiene a la gónada en la cavidad abdominal (mesorquio en los testículos y mesovario en los ovarios) y no se presentaban los tejidos característicos de un ovario o un testículo, solo se observaban células somáticas y en algunas gónadas células germinales.

En organismos de 6 a 10.5 cm se observaron gónadas con cavidad ovárica en proceso de formación o completamente formada, además en varios organismos se observó que una de las gónadas estaba más desarrollada que otra, este patrón de desarrollo concuerda con la descripción de Paredes (2018) para la totoaba, en la que la cavidad ovárica se formó cuando los organismos alcanzaron una longitud de 6.3 a 8 cm y que el desarrollo entre las dos gónadas (derecha e izquierda) no es sincrónico ni simétrico. La cavidad ovárica en la totoaba se formó a partir de dos elongaciones en cada uno de los bordes de la gónada, una elongación de la parte superior y otra de la parte inferior, las cuales al unirse forman una cavidad. La cavidad ovárica en peces teleósteos dependiendo de la especie se forma por elongaciones de la gónada y su posterior fusión o por cavitación (Mazzoni y Quagio, 2017). En los teleósteos cuya cavidad ovárica se origina a partir de elongaciones o fusiones gonadales, las elongaciones se forman a partir del crecimiento de células somáticas de la gónada (Mazzoni y Quagio, 2017; Health, 2019), las zonas de la gónada de donde

se derivan las elongaciones pueden variar dependiendo de la especie (Nagahama, 1983). *Tilapia mossambica* y *Tanichthys albonubes* son ejemplo de organismos cuya cavidad ovárica se forma por elongaciones gonadales. (Nakamura y Takahashi, 1973; Mazzoni y Quagio, 2017). En los organismos cuya cavidad se forma por cavitación, la cavidad se origina a partir del reacomodo del tejido somático interno de la gónada, cuando comienza el desarrollo las lamelas ováricas. *Corydoras schwartzi* es un ejemplo de organismos con este patrón de formación (Mazzoni y Quagio, 2017). De acuerdo con el patrón de formación de la cavidad ovárica observado en la totoaba, la cavidad ovárica, al igual que en la tilapia, se forma por el crecimiento de las células somáticas y la elongación de los bordes de la gónada.

Una vez formada la cavidad ovárica, en organismos de 13 cm o mayores, se observó un incremento en el espesor del tejido germinal en la parte central de la gónada que rodea la cavidad ovárica, aunque el epitelio germinal no era continuo alrededor de toda la cavidad ovárica. En algunos organismos se observó que entre mayor era su LT, el espesor del tejido germinal en el centro de la gónada también era mayor, y en otros organismos cuya LT era de 15 cm se observó el epitelio germinal tanto en la parte central de la gónada como en la periferia. En organismos de una mayor LT se observó la reducción del espesor del epitelio germinal central y la proliferación del tejido germinal en la periferia, cabe señalar que el epitelio germinal en la periferia del órgano es característico de un testículo de Totoaba, por tal motivo esos organismos se clasificaron como machos. Este patrón de desarrollo no coincide con el descrito por Paredes (2018), quien menciona que en organismos de 12.5 a 18.5 cm de longitud solo se observaron gónadas con cavidad o sin cavidad ovárica, esto probablemente se debió a que las muestras analizadas por Paredes (2018) tenían alteraciones histológicas ocasionadas por el proceso de descalcificación al que se expusieron antes de aplicar el resto del proceso histológico y por lo tanto no se pudieron identificar claramente algunas estructuras de la gónada. Para evitar estos problemas, en el presente trabajo se evitó la descalcificación de los organismos.

En los testículos de Totoaba se observó una cavidad central con células germinales a su alrededor. La formación de una cavidad en el estroma central de la gónada en algunas especies como *Tilapia mossambica*, es el indicio de que la gónada se va a diferenciar en un testículo, en las etapas posteriores del desarrollo, esta cavidad va a dar origen a los conductos deferentes (Nakamura y Takahashi, 1973). Los conductos deferentes, a diferencia de la cavidad ovárica, la cual se forma a partir del crecimiento de los bordes de la gónada y su posterior fusión o por cavitación (Mazzoni y Quagio, 2017), se originan solo por cavitación, y la cavidad que se forma es una cavidad estrecha ubicada en la parte central de la gónada en el tejido estromal (Nakamura et al., 1998). Cabe señalar que la apertura de la cavidad observada en los testículos de las totoaba de menor LT no era estrecha, mientras que en los organismos de mayor LT si lo

era, sin embargo, como no se tienen medidas de la amplitud de dicha cavidad en otras especies, la definición de estrecho queda sujeta a la interpretación del autor de cada trabajo.

En los testículos además de la presencia de dicha cavidad, se observó un proceso de degradación del epitelio germinal en el centro de la gónada, tejido que es característico del ovario de la totoaba (Paredes, 2018), además se observó la proliferación del tejido germinal en la periferia de la gónada, que es característico de los testículos de la totoaba. Esta secuencia de eventos permite suponer que, la totoaba es un organismo gonocórico secundario, cuya característica es que la gónada pasa por un estado intersexual y posteriormente, en una fracción de los organismos, hay reabsorción del tejido ovárico y se desarrolla un testículo (Lacadena, 1998; Pandian, 2012; Navara, 2018). El gonocorismo secundario es común en los peces teleósteos, en algunas especies como *Tanichthys albonube*, *Corydoras schwartzi* y *Amatitlania nigrofasciata*, la presencia de la cavidad ovárica es signo de que la gónada se va a desarrollar en un ovario (Mazzoni y Quagio, 2017), sin embargo, no en todos los casos ocurre de esa manera ya que en *Danio rerio*, en una parte de los individuos se forma la cavidad ovárica y posteriormente hay reabsorción del tejido ovárico y la gónada se desarrolla en un testículo, (Navara, 2018). A pesar de que el gonocorismo secundario es común en peces teleósteos y de que en la totoaba se encontraron evidencias para clasificarla como un organismo gonocórico secundario, cuyo modelo hipotético de diferenciación se describe en la Figura 34. Se deben de realizar estudios adicionales en los que se utilicen marcadores moleculares del sexo, u otras técnicas para la identificación de los diferentes tipos celulares de la gónada. También es necesario aumentar el número de muestras de ejemplares de diferentes longitudes, para corroborar si la cavidad observada en los testículos, se forma por cavitación o si es una derivación de la cavidad ovárica, como se señala en el presente trabajo.

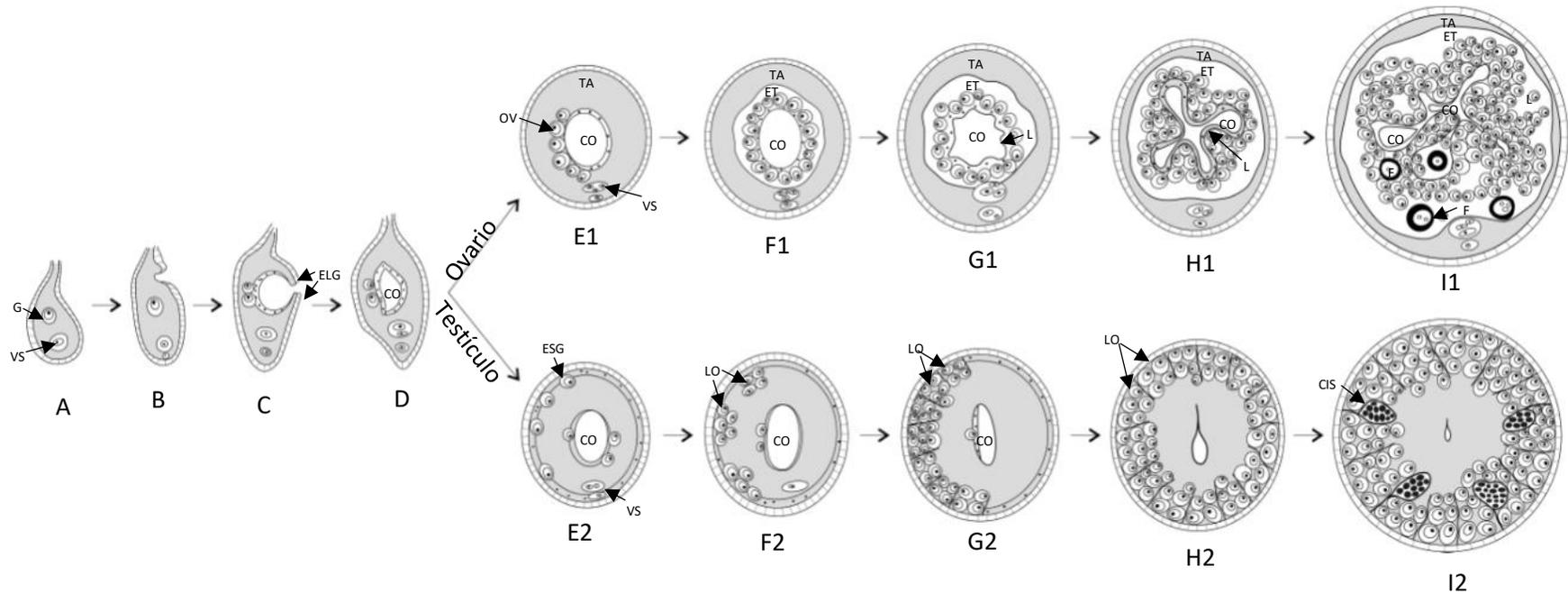


Figura 34. Modelo hipotético de la diferenciación del ovario y testículo de *Totoaba macdonaldi* (secciones transversales de las gónadas) elaborado a partir de cortes histológicos de ejemplares de diferentes edades y longitudes resumidos en las figuras 32 y 33. A, Gónada indiferenciada (figura 32-B, LT= 4.1 cm); B, Gónada con incisión de los futuros pliegues que darán origen a la cavidad ovárica (figura 32-C, LT=6.7 cm); C, Gónada con cavidad ovárica en formación (figura 32-E, LT=10.5 cm); D, Gónada con cavidad ovárica (figura 32-F, LT=10.4cm); E1, Ovario con proliferación de ovogonias solo en una parte central de la gónada (reconstrucción trasversal de la sección longitudinal de la figura 32-G LT=13 cm); F1, Ovario con proliferación de ovogonias en toda la parte central de la gónada y en toda la periferia de la cavidad ovárica (reconstrucción trasversal de la sección longitudinal de la figura 32-H, LT=14 cm); G1, Ovario con lamelas ováricas pequeñas (reconstrucción de la sección longitudinal de la figura 32-I, LT= 23.5 cm); H1, Ovario con lamelas ováricas grandes (reconstrucción trasversal de la sección longitudinal de la figura 32-K, LT=27 cm); I1, Ovario con folículos (reconstrucción trasversal de la sección longitudinal de la figura 32-L, LT=28 cm); E2, Testículo con cavidad y gonias en la periferia y centro de la gónada (reconstrucción trasversal de la sección longitudinal de la figura 33-D.1, LT=15 cm); F2, Testículo con algunos lóbulos dispersos en la periferia de la gónada, cavidad y tejido germinal tanto en la periferia como en el centro de la gónada (reconstrucción trasversal de la sección longitudinal de la figura 33-E, LT= 15 cm); G2, Testículo con lóbulos solo en una parte de la periferia de la gónada, cavidad y tejido germinal tanto en la periferia como hacia el centro de la gónada (reconstrucción trasversal de la sección longitudinal de la figura 33-F LT=21 cm); H2, Testículo con lóbulos en toda la periferia de la gónada (reconstrucción trasversal de la sección longitudinal de la figura 33-I, LT=27.5 cm); I2, Testículo con lóbulos en toda la periferia de la gónada y cistos con espermatocitos (reconstrucción trasversal de la sección longitudinal de la figura 33-J, LT= 29cm); GN, Gónada; M, Mesenterio; VS, Vaso sanguíneo; EG, Epitelio germinal; LO, Lóbulo; CIS, Cisto; CO, Cavidad ovárica; ESG, Espermatogonia; OV, Ovogonia; COF, Cavidad ovárica en formación; ELG, Elongación de la gónada; TA, Túnica albugínea; ET, Estroma; F, Folículo ovárico; L, lamelas o crestas ováricas y EM, Espermatocitos.

Capítulo 5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

La exposición de *Totoaba macdonaldi* a temperaturas de 18, 22, 26 y 30°C entre los 24 a los 120 DDE no influyó de manera estadísticamente significativa en el proceso de diferenciación sexual por lo que no tiene un sistema de determinación sexual por temperatura.

No se observaron diferencias en las concentraciones de estradiol y testosterona en la sangre de las hembras y machos de *Totoaba macdonaldi* de 213 DDE.

No se observaron diferencias significativas en la longitud patrón entre hembras y machos de *Totoaba macdonaldi* a los 213 DDE.

El diámetro de las gonias (ovogonias y espermatogonias) de *Totoaba macdonaldi* es de 10 a 13 μm .

Todos los organismos menores a 6 cm de longitud total (LT) tenían gónadas indiferenciadas.

En los organismos de 6 a 10.5 cm (LT) se observó la cavidad gonadal en formación o totalmente formada.

Las hembras de *Totoaba macdonaldi* se diferenciaron a partir de los 13 cm de LT.

Los machos de *Totoaba macdonaldi* se diferenciaron a partir de los 15 cm LT.

En el ovario de *Totoaba macdonaldi* la proliferación inicial de ovogonias ocurre solo en una sección medular de la gónada, posteriormente la proliferación se presenta alrededor de toda la cavidad ovárica.

En *Totoaba macdonaldi* la formación de las lamelas ováricas ocurre después de la proliferación de las ovogonias en hembras mayores a 20 cm de LT.

El ovario de *Totoaba macdonaldi* se caracteriza por que el epitelio germinal está dispuesto en la parte central de la gónada, alrededor de la cavidad ovárica.

Los testículos de *Totoaba macdonaldi* se caracteriza por tener el tejido germinal en la región cortical de la gónada, en contraste, en los ovarios el tejido germinal está ubicado en la región medular, en el borde de la cavidad ovárica.

En el testículo de *Totoaba macdonaldi* las espermatogonias proliferan inicialmente en una sección de la periferia de la gónada y posteriormente proliferan en toda la periferia de la gónada.

En los testículos de *Totoaba macdonaldi* primero ocurre la proliferación de espermatogonias aisladas en la periferia de la gónada y posteriormente se organizan formando los lóbulos espermáticos.

5.2 Recomendaciones

Evaluar el efecto de la exposición de la *Totoaba macdonaldi* a diferentes temperaturas durante un periodo de mayor amplitud, desde el día 10 DDE y hasta que los organismos alcancen los 17 cm de longitud total.

Desarrollar los experimentos de exposición a la temperatura eliminando los efectos potenciales del estrés asociado a la densidad de cultivo y a las concentraciones de oxígeno disuelto y nitrógeno amoniacal total.

Estudiar las concentraciones de estradiol y testosterona en sangre en una serie de tiempo para poder identificar la talla/edad en la que sea posible diferenciar el sexo mediante el perfil de esteroides sexuales.

Evaluar el crecimiento de la *Totoaba macdonaldi* hasta la etapa de pubertad (edad de tres o cuatro años), para verificar si es en esta etapa donde se produce la diferencia de tallas entre hembras y machos.

Utilizar otros métodos de identificación sexual por ejemplo la laparoscopia o los marcadores moleculares.

Literatura citada

- Abdo- de la Parra, M., Rodríguez-Ibarra, L. Rodríguez-Montes de Oca, G., Velasco-Blanco, G., Ibarra-Casto, L. 2015. Estado actual del cultivo de larvas del pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*). Lat. Am. J. Aquat. Res. 43(3), 415-423.
- Alfaro, V., Blasco, J., Carbonell, T., Gutierrez, J., Navarro, I., Pagés, T., Palacios, L., Palomeque, J., Plans, J., Riera, M., Puy-Sáiz, M., Torrela, J.R., Viscor, G. 2005. Fisiología animal. Volumen I. Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona. Barcelona.
- Argemí, J., Audí, L., Borrajo, E., Bueno, M., Casado, E., Diéguez, C., Ferrández, A., Molina, J., Moya, M., Peña, J., Sáez J., Tojo, R. 1997. Tratado de endocrinología pediátrica. (2da Ed.) Díaz de Santos, S. A., Madrid.
- Arvizu, J., Chavéz, H. 1972. Sinopsis sobre la biología de la Totoaba, *Cynoscion macdonaldi* Gilbert, 1890. FAO. 70(37) 016-08.
- Auró, A., Ocampo, L. 1999. Diagnóstico del estrés en peces. Veterinaria México. 30(4), 337-344.
- Baroiller, J.F., D’Cotta, H. 2016. The reversible sex of gonochoristic fish: insights and consequences. Sexual Development. 10,242-266. doi:10.1159/000452362.
- Bernasconi, J., Cubillos, L., Acuna, E., Perier, R., Giácomo, E. 2015. Crecimiento, madurez y mortalidad del pez gallo *Callorhynchus callorinchus*, en el Golfo San Matías, Patagonia Norte, Argentina. Revista de Biología Marina y Oceanografía. 283(2), 283-298. doi: 10.4067/s0718-19572015000300007.
- Barneche, D., Robertson, D., White, C., Marshall, D. 2018. Fish reproductive-energy output increases disproportionately with body size. Science. 360(6389), 642-645. doi: 10.1126/science.aao6868.
- BioCancer, 2019. Reacciones de aromatización. Consultado el 2 de mayo de 2019, de <http://www.biocancer.com/journal/1022/7-reacciones-de-aromatizacion>
- Blázquez, M., Navarro-Martín, L., Piferre, F. 2009. Expression profiles of sex differentiation-related genes during ontogénesis in the European sea bass acclimated to two different temperatures. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution. 312B(7), 686-700. doi:10.1002/jez.b.21286.
- Brennan, J., Capel, B. 2004. One tissue, two fates: molecular genetic events that underline testis versus ovary development. Nature reviews Genetics 5(7), 509-521. doi:10.1038/nrg1381.
- Burgoin-Cota, M. 2015. Estudio de la incorporación de la levadura viva *Debaryomyces hansenii* a través del rotífero *Branchionus rotundiformis* durante los primeros días de desarrollo del juerel *Seriola rivoliana*. Tesis de maestría en ciencias. Centro de investigaciones biológicas del noroeste, S. C. 98 pp.
- Calaf, J., Espinós, J. J., Targa, C. 2009. Regulación neuroendocrina de la función gonadal. Esteroidogénesis y acción de las hormonas esteroides. En: Bajo, J. Coroleu, B. (Eds.), Fundamentos de reproducción. EDITORIAL MEDICA PANAMERICANA. España. pp. 13-22.
- Callard, G. 1991. Espermatogénesis. En: Pang, P., Scheribman, M. (Eds.), Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biochemicals implications. Academic press. New York. pp 303-341.

- Carrillo, M., Zanuy, S., Bayarri, M. J. 2009. El control ambiental de la reproducción de los peces con especial referencia al control del ciclo sexual, de la pubertad y de la precocidad. En: Carrillo, M. (Comp.), La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura. Madrid. pp. 173-246.
- Carvalho, A., Sampaio, M., Varandas, F., Klaczko, L. 1998. An experimental demonstration of Fisher's principle: Evolution of sexual proportion by natural selection. *GENETICS*. 148(2), 719-731
- Conover, D. O. 1984. Adaptive significance of temperature-dependent sex determination in a fish. *American society of naturalists*. 123(3), 297-313.
- Conover, D. O., Kinard, B. E. 1981. Environmental sex determination: Interaction of temperature and genotype in fish. *Science*, 213(4507), 577-579. doi:10.1126/science.213.4507.577
- Currie, S., Shulte, P. 2014. Thermal stress. En: Evans, D., Claiborne, J., Currie, S. (Eds.), *The physiology of fishes*. (4ta Ed.) CRC Press. New York. pp. 257-288.
- De Anda-Montañez, J., García de León, F., Zenteno-Savín, T., Balart-Paez, E., Méndez-Rodríguez, L., Bocanegra-Catillo, N., Martínez-Aguilar, S., Campos-Dávila, L., Román Rodríguez, M., Valenzuela-Quíñonez, F., Rodríguez-Jaramillo, M., Meza-Chávez, M., Ramírez-Rosas, J., Saldaña-Hernández, I., Olgúin-Monroy, N., Martínez-Delgado, M. 2013. Estado de salud y estatus de conservación de la(s) población(es) de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) en el Golfo de California: una especie en peligro de extinción. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, Baja California Sur. Informe Final, SNIB-CONABIO. Proyecto No. HK050, México, D.F.
- DNAT ecosistemas. 2019. Corvina blanca *Totoaba macdonaldi*. Consultado el 22 de agosto de 2019, de <https://www.dnatecosistemas.es/tienda-peces-agua-dulce-y-fria-y-marino/peces-agua-dulce-especies-cites-i-1/corvina-blanca-totoaba-macdonaldi-scleropages-inscriptus-arowana-asiatica-scleropages-formosus-cites-pristidae-spp.acipenser-sturio.html>
- Estevez, A., 2018. Manual técnico-Corvina (*Argyrosomus regius*). Diversify New species for EU aquaculture. EU.
- Fanjul, M.L. 2008. Temperatura y sobrevivencia. En: Fanjul, M., Hiriart, M. (Eds.), *Biología funcional de los animales I. Una fisiología comparada metabólica y ambiental*. Siglo XXI editores. S. A. de C. V., México, DF. pp. 55-86.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 1975. Manual de ciencia pesquera. Parte 2 Métodos para investigar los recursos y su aplicación. Roma.
- Folkvord, A. 1997. Ontogeny of cannibalism in larval and juvenile fishes with special emphasis on Atlantic cod. En: Chambers, R., Trippel, E. (Eds.), *Early Life History and Recruitment in Fish Populations*. CHAPMAN & HALL. London. pp. 251-278.
- Gallo, G., Rodríguez, L., Malaver, D., Zapata, T. 2012. Estudio del efecto de la ingesta de una sola dosis de dos inhibidores de la aromatasa sobre el perfil hormonal sexual de voluntarios sanos. *Rev. colomb. cienc. quim. farm.* 41(1), 67-80.
- Goikoetxea, A., Todd, E., Gemmell, N. 2017. Stress and sex: does cortisol mediate sex change in fish?. *Reproduction and fertility*. 155(6), 149-160. doi:10.153/REP-17-0408.

- Goncalves, D., Oliveira, R. 2011. Hormones and Sexual Behavior of Teleost Fishes. En: Norris, D., López, K. (Eds.), Hormones and Reproduction of Vertebrates. Fishes. Elsevier. USA. pp. 119-148.
- González, A., Piferrer, F. 2002. Characterization of Aromatase activity in the Sea Bass: Effects of temperatura and different catalytic properties of brain and ovarian homogenates and microsomes. Journal of experimental zoology. 293, 500-510.
- Grier, H. 2000. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). Journal of Morphology. 243(3), 265-281.
- Guiguen, Y., Fostier, A., Piferrer, F., Chang CF. 2009. Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. ELSEVIER. 165(3), 352-366. doi: 10.1016/j.ygcen.2009.03.002.
- Hamaguchi, S. 1982. A light-and electron-microscopic study on the migration of primordial germ cells in the teleost, *Oryzias latipes*. Cell and Tissue Research. 227(1), 139-151. doi, 10.1007/bf00206337.
- Hattori, R., Fernandino, J., Kishii, A., Kimura, H., Kinno, T., Oura, M., Somoza, G., Yokota, M., Strüssmann, C., Watanabe, S. 2009. Cortisol-Induce Masculinization: Does thermal stress affect gonadal fate in pejerrey, a telost fish with temperature-dependent sex determination?. PLOS ONE. 4(8), e6548. doi:10.1371/journal.pone.0006548
- Health, B. 2019. Follicular cells. Consultado el 27 de julio de 2019, de <https://www.barnardhealth.us/follicular-cells/info-uln.html>
- Hecht, T., Pienaar, A. G. 1993. A review of cannibalism and its implications in fish larviculture. Journal of the World Aquaculture Society. 241, 246-261.
- Helfman, G., Collette, B., Facey, D., Bowen, B. 2009. The diversity of fishes. Biology, Evolution, and Ecology. (2da Ed.) Wiley-Blackwell. Malaysia.
- Hochachka, P., Somero, G, 1971. Biochemical adaptation to the environment. En: Hoar, W., Randall, D. (Eds.), Fish Physiology Volume VI. Academic Press. New York. pp. 100-156.
- Infobae. 2017. Totoaba, un pez mexicano más caro que la cocaína por su "poder" afrodisíaco. Consultado el 6 de agosto de 2019, de <https://www.infobae.com/america/america-latina/2017/01/15/totoaba-un-pez-mexicano-mas-caro-que-la-cocaina-por-su-poder-afrodisiaco/>
- Johnston, I., Vieira, V., Hill, J. 1996. Temperature and ontogeny in ectotherms: muscle phenotype in fish. En: Johnston, I., Bennett, A. (Eds.), Animals and temperature. Phenotypic and evolutionary adaptation. Cambridge university press. New York. pp. 153-182.
- Jover, C. 2009. La energía en la nutrición de los peces. En: Sanz, F. (Comp.), La nutrición y alimentación en piscicultura. Fundación Observatorio Español de Acuicultura. Madrid. pp 47-88.
- Kingsolver, J. 2009. The well-temperated biologist. American Society of Naturalists Presidential Address. Am Nat 174: 755–768.
- Kishida, M., Callard, G. 2001. Distinct Cytochrome P450 aromatase isoforms in Zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. Endocrinology. 142(2), 740-750. doi:10.1210/endo.142.2.7928.

- Kitano, T., Takamune, K., Kobayashi, T., Nagahama, Y. 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(2), 167-173. doi:10.1677/jme.0.0230167.
- Kitano, T., Takamune, K., Nagahama, Y., Abe, SI. 2000. Aromatase inhibitor and 17 α -methyltestosterone cause sex-reversal from genetic females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Molecular Reproduction and Development*. 56, 1-5.
- Knapp, R., Marsh-Matthews, E., Vo, L., Rosencrans, S. 2010. Stress hormone masculinizes female morphology and behavior: *Physiology*. 7, 150-152. doi: 10.1098/rsbl.2010.0514.
- Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., Guan, G., Nagahama, Y. 2008. Sexual dimorphic expression of DMRT1 and Sox9 during gonadal differentiation and hormone-induced sex reversal in the teleost fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Dev. Dyn*. 237, 297-306.
- Kobayashi, T., Matsuda, M., Kajiura-kobayashi, H., Suzuki, A., Saito, N., Nakamoto, M., Shibata, N., Nagahama, Y. 2004. Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the Medaka, *Oryzias latipes*. *DEVELOPMENTAL DYNAMICS*. 231(3), 518-526. doi. 10.1002/dvdy.20158.
- Koc, N., Yüce, R., 2012. A light-and electron microscopic study of primordial germ cells in the zebra fish (*Danio rerio*). *Biol Res*. 45(4), 331-336. doi. 10.4067/S0716-97602012000400001.
- Lacadena, J. 1998. Protoginia y protandria: determinismo genético y diferenciación sexual. En: Botella, L., Fernández de Molina, A. (Eds.), *La evolución de la sexualidad y los estados intersexuales*. Díaz de Santos. Madrid. pp. 141-143.
- Lagler, K., Bardarch, J., Miller, R., May-Passino, D. 1984. *Ictiología*. AGT editor, S. A. México.
- Lamba, V., Goswami, S., Sundararaj, B. 1983. Circannual and circadian variations in plasma levels of steroids (cortisol, estradiol-17 β estrone, and testosterone) correlated with the annual gonadal cycle in the catfish, *Hereropneustes fossilis* (Bloch). *ELSEVIER*. 50(2), 205-225. doi:10.1016/0016-6480(83)90221-6.
- López, L., Coronel, L. 2016. La totoaba: gigante del alto golfo de California. *Centros de Estudio Sobre la Universidad de la Universidad Autónoma de Baja California*. México, D. F.
- Lucas, A. 2002. *Bioenergetics of Aquatic Animals*. Taylor & Francis. UK.
- Mankiewicz, J., Godwin, J., Holler, B., Turner, P., Murashige, R., Shamey, R., Daniels, H., Borski R. 2013. Masculinizing effect of background color and cortisone in a flatfish with environmental sex-determination. *Integr. Comp. Biol*. 53(4), 755-65. doi: 10.1093/icb/ict093.
- Manzo, J. 2004. Testosterona, química cerebral y conducta sexual masculina. *Ciencia*. Consultado el 3 de mayo de 2019 de https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/55_3/Testosterona.pdf.
- Matsuda, M., Yoshitaka, N., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., konayashi, T., Morrey, C. Shibata, N., Shuichi, A., Shimizu, N., Hori, H., Hamaguchi, S., Sakaizumi M. 2002. DMY is a Y-specific DM-domain

- gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, 417(6888), 559-563. doi:10.1038/nature751.
- Mazzoni, S., Quagio, I. 2017. Ovary differentiation and activity in teleostei fish. INTECH. doi:10.5772/intechopen.69022.
- McMillan, D.B. 2007. *Fish Histology, Female reproductive system*. Springer. Canada.
- Mohammandi, G., Khodadadi, M., Amini, L. 2015. Study of gonads maturations female of *Liza macorlepis* in Mousa Bay (North of Persia Gulf). *European Aquaculture Society*. Consultado el 21 de junio de 2019 de <https://www.was.org/easonline/AbstractDetail.aspx?i=4231>
- Nagahama, Y. 1983. The functional morphology of teleost gonads. En: Hoar, W., Randall, D., Donaldson, E. (Eds.), *Fish physiology, Volume IX reproduction. Part A Endocrine tissues and hormones*. ACADEMIC PRESS, INC. Florida. pp. 223-276.
- Nakamura, M., Takahashi, H. 1973. Gonadal sex differentiation in *Tilapia mossambica*, with special regard to the time of estrogen treatment effective in inducing complete feminization of genetic males. *Bulletin of The Faculty of Fisheries Hokkaido University*. 24(1), 1-13.
- Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X-T., Nagahama, Y. 1998. Gonadal sex differentiation in teleost fish. *The Journal of Experimental Zoology*. 281(5), 362-372.
- Nakashima, E. 1916. *Cynoscion macdonaldi* Gilbert. *Copeia*. 37, 85-86
- Navara, K. 2018. *Choosing sexes. Mechanisms and adaptive patterns of sex allocation in vertebrates*. Springer. Georgia
- Navarro-Martín, L., Viñas, J., Ribas, L., Díaz, N., Gutiérrez, A., Di Croce, L., Piferrer, F. 2011. DNA Methylation of the Gonadal Aromatase (cyp19a) Promoter Is Involved in Temperature-Dependent Sex Ratio Shifts in the European Sea Bass. *PLoS Genet*. 7(12): e1002447. doi:10.1371/journal.pgen.1002447
- Noga, E. J. 2010. *Fish disease: Diagnosis and treatment*. Iowa State university Press, Iowa.
- Norris, D., Lopez, K. 2011. *Hormones and reproduction of vertebrates. Volume: 1 Fishes*. ELSEVIER. United States of America.
- 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.org/10.1371/journal.pone.0002837.
- Pandey, K., Shukla, J. P. 2007. *Fish & Fisheries*. (2da ed.) University Students. India.
- Pandian, T. J. 2010. *Sexuality in Fishes*. Science Publishers, Enfield/CRC Press. Boca Raton, FL., USA.
- Pandian, T. J. 2011. *Sex Determination in Fish*. Science Publishers, Enfield/CRC Press. Boca Raton, FL., USA.
- Pandian, T. J. 2012. *Genetic Sex differentiation in Fish*. CRC Press. Boca Raton, FL., USA.

- Paredes Martínez, A. E. 2018. Descripción de la gonadogénesis e identificación del periodo de diferenciación sexual de *Totoaba macdonaldi*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. xiii, 75 hojas.
- Parenti, L., Grier, H. 2004. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Intergr. COMP. BIOL.* 44, 333-348.
- Patiño, R., y Redding, J. 2000. Reproductive systems. En: Ostrander, G. (Eds.), *The laboratory fish*. Academic Press. pp. 489-502.
- Paul-Prasant, B., Nakamura, M., Nagahama, Y. 2011. Sex Determination in Fishes. En: Norris, D., López, K. (Eds.), *Hormones and Reproduction of Vertebrates. Fishes*. Elsevier. USA. pp. 1-12.
- Piferrer, F. 2009. Determinación y diferenciación sexual en los peces. En: Carrillo, M. (Comp.), *La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura*. Madrid. pp. 247-312.
- Piferrer, F., Baker, I., Donalson, E. 1993. Effects of natural, synthetic, aromatizable, and nonaromatizable androgens in inducing male sex differentiation in genotypic female Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 91, 59-65.
- Ramírez-León, M., Álvarez-Borrego, S., Turrent, C., Gaxiola, G., Heckel, G. 2015. El aporte de nutrientes del río Colorado al norte del golfo de California no se requiera para mantener un ecosistema pelágico productivo. *Ciencias marinas.* 41(2), 169-188.
- Randall, D., Burggren, W., French, K. 2002. *ECKERT Fisiología animal mecanismos y adaptaciones*. (4ta ed.) Mc- GRAW-HILL INTERAMERICANA. Madrid
- Rinchard, J., Kestemont, E., Kühn, R., Fostier, A. 1993. Seasonal Changes in plasma levels of steroid hormones in an asynchronous fish the Gudgeon *Gobio gobio* L. (Teleostei, Cyprinidae). *ELSEVIER.* 92(2), 168-178. doi: 10.1006/gcen.1993.1153
- Robaina, L., Schuchardt, D. 2009. Proteínas en dietas para peces. En: Sanz, F. (Comp.), *La nutrición y alimentación en piscicultura*. Fundación Observatorio español de Acuicultura. Madrid. pp. 89-131.
- Russell, D., McDougall A. 2008. Reproductive biology of mangrove jack (*Lutjanus argentimaculatus*) in northeastern Queensland, Australia. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research.* 42(2), 219-232. doi: 10.1080/00288330809509950.
- Sarasquete, C., González M.L., Muñoz-Cueto, J. 1999. *Patología, Fisiología y Biotoxicología en especies acuáticas*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid.
- SEMARNAT (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2018. La totoaba especie en peligro de extinción víctima del tráfico ilegal. Consultado el 9 de agosto de 2019 de <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/la-totoaba-especie-en-peligro-de-extincion-victima-del-trafico-ilegal?idiom=es>
- Strüssmann, C., Cota, J., Phonlor, G., Higuchi, H., Takashima, F. 1996. Temperature effects on sex differentiation of two South American atherinids, *Odontesthes argentinensis* and *Patagonina hatcheri*. *Environmental Biology of Fishes.* 47, 143-153

- Svåsand, T., Jorstad, K., Otterá, H., Kjesbu, O. 1996. Differences in growth performance between Arcto-Norwegian and Norwegian coastal cod reared under identical conditions. *Journal of Fish Biology*. 49(1),108-119. doi: 10.1111/j.1095-8649.1996.tb00008.x
- Taghizadeh, V., Imanpoor, M., Mehdinejad N. 2013. Study the seasonal steroid hormones of common carp in Caspian Sea, Iran. *Springer*. 2(93), 1-4. doi: 10.1186/2193-1801-2-193
- Talamás-Rohana, E. 2001. Efecto de la temperatura sobre la preferencia térmica y el metabolismo de juveniles de (*Totoaba macdonaldi*) (Gilbert,1890). Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. vi 63 pp.
- Taranger, G., Carrillo, M., Schulz, R., Fontaine, P., Zanuy, S., Felip, A., Weltzien, F., Dufour, S., Karlsen, O., Norberg, B., Andersson, E. Hansen, T. 2010. Control of puberty in farmed fish. *ELSEVIER*. 165(3), 483-515. doi.10.1016/j.yggen.2009.05.004
- Treasurer, J., Atack, T., Rolton, A., Walton, J., Bickerdike, R. 2011. Social, stocking density and dietary effects on the failure of farmed cod *Gadus morhua*. *Aquaculture*. 322(323), 241-248. doi:10.1016/J.aquaculture.2011.10.004
- True, C. D. 2012. Desarrollo de la biotecnia de cultivo de *Totoaba macdonaldi*. 121 pag. Tesis de Doctorado. Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California
- Uribe, M., Grier, H., Mejía-Roa, V. 2014. Comparative testicular structure and spermatogenesis in bony fishes. *National Library of Medicine National Institutes of Health*. 4(3), e983400. doi:10.4161/21565562.2014.983400
- Wedemeyer, G. 1997. Effects of rearing conditions on the health and physiologic quality of fish in intensive culture. En: Iwana, K., Pickering, A., Sumpter, J., Schreck, C., (Eds.), *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University Press. Cambridge. pp. 35-71.
- Wootton, R., Smith, C. 2015. *Reproductive biology of teleost fishes*. WILEY Blackwell. UK.
- Yön, N., Akbulut, C. 2015. Identification of primordial germ cells: Cytological, histological and immunohistochemical aspects. *Brazilian Archives of Biology and technology*. 58(2), 222-228.
- Young, G., Kusakabe, M., Nakamura, I., Lokman P., Goetz, F. 2005. Gonadal Steroidogenesis in Teleost Fish. En: Melarmed, P., Sherwood, N. (Eds.), *Hormones and their receptors in fish reproduction*. World Scientific, London. pp. 155-223
- Zanuy, S., Carrillo, M., Rocha, A., Molés, G. 2009. Regulación y control hormonal del proceso reproductor de los teleósteos. En: Carrillo, M. (Comp.), *La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura*. Madrid. pp. 99-172.

Anexo A

Constitución de la solución Davidson's

Tabla 3: Reactivos utilizados en la preparación de 1 litro de solución Davidson's.

Reactivo	Cantidad (ml)
Glicerina	100
Etanol al 96%	300
Formaldehído al 37%	200
Agua de mar filtrada	300
Ácido Acético	100

Anexo B

Técnica de deshidratación en el procesador de tejidos automático

Tabla 4: Reactivos y tiempo de inmersión utilizados en la deshidratación de tejidos

Reactivo	Tiempo de inmersión de los tejidos
Etanol al 80 %	1 hora
Etanol al 96% I	2 horas
Etanol al 96% II	2 horas
Etanol al 100% I	2 horas
Etanol al 100% II	2 horas
Etanol al 100% III	1 hora
Xileno I	1 hora
Xileno II	2 horas
Parafina I	2 horas
Parafina II	2 horas
Parafina III	2 horas

Anexo C

Protocolo de desparafinado y tinción de los tejidos

Tabla 5: Protocolo de desparafinado

Reactivo	Tiempo o número de inmersiones
Xilol I	8 min
Xilol II	5 min
Alcohol etílico absoluto I	15 inmersiones
Alcohol etílico absoluto II	15 inmersiones
Alcohol etílico al 95% I	15 inmersiones
Alcohol etílico al 95% II	15 inmersiones
Agua de la llave	Lavar durante 3 min o hasta que no haya xileno flotando en el agua

Tabla 6: Protocolo de tinción con hematoxilina-Eosina

Reactivo	Tiempo y/o inmersiones
Hematoxilina	2 min con agitación cada 10 seg
Agua de la llave	Enjuagar durante 3 min
Alcohol ácido	1.5 min
Agua de la llave	Enjuagar durante 5 min
Carbonato de litio	2 min
Agua de la llave	3 min
Eosina	1 min con agitación constante
Alcohol etílico al 95 % I	30 inmersiones
Alcohol etílico al 95 % II	30 inmersiones
Alcohol etílico al 100% I	30 inmersiones
Alcohol etílico al 100% I	30 inmersiones
Xileno I	2 min
Xileno II	10 min

NOTA: Alcohol ácido: (0.3 ml de HCl/ 200 ml 70% ETOH)

Anexo D

Longitud total de organismos expuestos a diferentes tratamientos de temperatura (18, 22, 26 y 30°C) de los 24 a los 120 DDE, y posteriormente expuestos a igual temperatura (26 °C de los 121 a los 180 DDE y 16°C de los 181 a los 213 DDE) (Figura 1.)

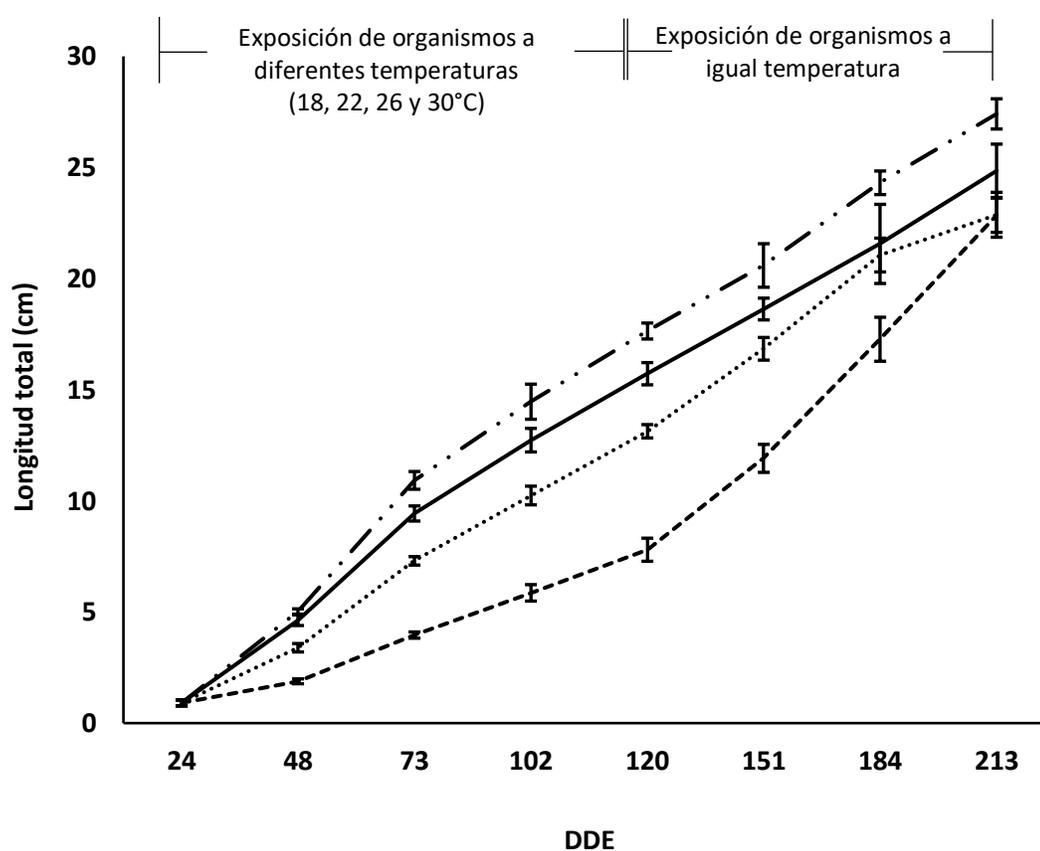


Figura 35. Longitud total de *Totoaba macdonadi* expuesta inicialmente a diferentes temperaturas y posteriormente a igual temperatura. Línea con guiones, 18°C; Línea punteada, 22°C; Línea continua, 26°C; Línea con punto y guion, 30°C.