



**UNIVERSIDAD DE QUINTANA ROO**

---

**División de Desarrollo Sustentable**

**Desarrollo embrionario de *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1842) (Tetraodontiformes: Tetraodontidae)**

**TESIS**  
Que para obtener el grado de  
**LICENCIADO EN MANEJO DE RECURSOS**  
**NATURALES**

**Presenta**  
**Carlos Aarón Cetzal Aké**

**Director de Tesis**  
**Dr. Juan Manuel Martínez Brown**

**Cozumel, Q. Roo, diciembre de 2018.**



# UNIVERSIDAD DE QUINTANA ROO

División de Desarrollo Sustentable

Tesis elaborada bajo la supervisión del comité de Tesis del programa de  
Licenciatura y aprobada como requisito para obtener el grado de:

LICENCIADO(A) EN  
MANEJO DE RECURSOS NATURALES

COMITÉ DE TESIS



Director(a): Dr. Juan Manuel Martínez Brown

Nombre

Asesor(a): Dr. Alejandro Collantes-Chávez Costa

Nombre

Asesor(a): Dra. Rebeca Sánchez Cárdenas

Nombre

Cozumel, Quintana Roo, México, diciembre de 2018



## ÍNDICE

<b>Resumen</b>	5
<b>1. Introducción</b>	6
<b>2. Antecedentes</b>	8
2.1. Ontogenia inicial de peces	8
2.2. Generalidades biológicas	9
2.2.1. Ciclo de vida (autoecología)	9
2.2.2. Reproducción	9
2.2.3. Alimentación	10
2.3. Estudios sobre la producción de <i>S. annulatus</i> en cautiverio	10
2.4. Estudios sobre ontogenia inicial en Tetraodontidae	10
<b>3. Justificación</b>	12
<b>4. Planteamiento del problema</b>	13
<b>5. Objetivos</b>	13
5.1. General	13
5.2. Particulares	13
<b>6. Materiales y métodos</b>	14
6.1. Obtención de material biológico	14
6.2. Toma de muestras, fijación, fotografiado y medición	15
6.3. Procesamiento histológico	16
6.4. Descripción de la ontogenia inicial	18
<b>7. Resultados</b>	20
7.1. Periodo embrionario	20
7.1.1. Fase de segmentación	20
7.1.1.1. Paso E1. Activación	20
7.1.1.2. Paso E2. Segmentación	21
7.1.1.3. Paso E3. Estereoblástula	23
7.1.1.4. Paso E4. Gástrula	26



## RESUMEN

El desarrollo embrionario de botete diana *Sphoeroides annulatus* fue caracterizado con base en la teoría de la ontogenia en saltos. El periodo embrionario se dividió en 41 estadios y 9 pasos que fueron definidos a partir de evidencia morfológica, histológica y conductual. La duración del periodo embrionario fue de 115.4 h a 26°C. Los umbrales ontogénicos en el periodo embrionario de *S. annulatus* fueron: activación (E1), segmentación (E1-E2), estereoblástula (E2-E3), gastrulación (E3-E4), somitogénesis (E4- E5), sincronización neuromuscular (E5- E6), inicio del funcionamiento del corazón (E6- E7), eclosión (E7- E8), inicio de la circulación sanguínea (E8-E9). Los huevos presentaron un diámetro promedio de  $684 \pm 34 \mu\text{m}$ , y se caracterizaron por ser esféricos, transparentes, con una gran cantidad de glóbulos de aceite, así también con propiedades adherentes y flotabilidad negativa. La eclosión inició a las 52.35 h. Al eclosionar la longitud notocordal fue de  $1416 \pm 41 \mu\text{m}$ . Los embriones libres mostraron fototaxis positiva y ya eran capaces de nadar en la columna de agua. Al final del periodo embrionario, a las 115.5 h, la longitud notocordal de las larvas fue de  $1779 \pm 51 \mu\text{m}$ . Comparado con los patrones de desarrollo de otros tetraodontidos, *S. annulatus* presentó procesos de heterocronía interespecífica en diferentes pasos. Debido a las características mostradas durante su desarrollo embrionario, a esta especie se le puede incluir en el gremio de desovadores en rocas y gravas con larvas pelágicas (litopelagofilos), dentro de la clasificación de los estilos reproductivos considerada en la teoría del desarrollo en saltos.

Palabras clave: desarrollo embrionario, ontogenia, Tetraodontidae, estadios embrionarios, umbrales

### 1. INTRODUCCIÓN

Los peces de la familia Tetradontidae (conocidos popularmente como botetes o peces globo) forman parte de la ictiofauna tropical y subtropical de ambientes dulceacuícolas, estuarinos y marinos en los océanos Atlántico, Índico y Pacífico (Nelson *et al.*, 2016). En esta familia existen alrededor de 26 géneros (Nelson *et al.*, 2016) y 190 especies válidas (Eschmeyer y Fong, 2018).

En las costas del Pacífico mexicano, esta familia se encuentra representada por nueve especies contenidas en cuatro géneros: *Sphoeroides annulatus*, *S. sechurae*, *S. lobatus*, *S. pachygaster*, *S. lispus*, *Arothron hispidus*, *A. meleagris*, *Canthigaster punctatissima* y *Lagocephalus lagocephalus* (Froese y Pauly, 2018). Del género *Sphoeroides*, el botete diana *S. annulatus* (Jenyns 1842), es la especie más abundante dentro de su distribución geográfica (Thomson *et al.*, 2000). Esta especie habita ambientes marinos y estuarinos, desde San Diego, Estados Unidos de América, hasta Perú, incluyendo las islas Galápagos y el Golfo de California, México (Thomson *et al.*, 2000).

En México, *S. annulatus* sostiene una pesquería desde 1972 (Ocampo-Peraza, 1983). El aumento progresivo de la demanda local, principalmente en el noroeste de México y los altos precios que alcanza en el mercado, propiciaron que las capturas incrementaran sin algún tipo de regulación pesquera (Sánchez-Cárdenas, 2007). Como consecuencia del desabasto del mercado local, de su importancia económica a nivel regional y de su potencial de exportación a mercados asiáticos, desde finales de los 90 se iniciaron los esfuerzos para desarrollar la tecnología de cultivo de esta especie (Abdo-de la Parra *et al.*, 2013). Sin embargo, a pesar de su importancia pesquera y de su potencial acuícola, a la fecha la información sobre la biología del desarrollo de *S. annulatus* es escasa.

Algunos trabajos que abordan aspectos del desarrollo embrionario han sido realizados con un enfoque principalmente biotecnológico. Por ejemplo, sobre procesos de incubación, manejo de embriones y larvicultura (Abdo-de la Parra, *et al.*, 2001); sobre el desarrollo del sistema digestivo y función enzimática (García-Gasca *et al.*, 2006); y una descripción parcial del desarrollo embrionario con un enfoque gradualista (Martínez-Palacios *et al.*, 2002). Hasta ahora, no existe información detallada sobre los procesos del desarrollo embrionario de *S. annulatus*, generada con base en una aproximación morfofuncional en el contexto de la teoría del desarrollo en saltos. Esta teoría permite una interpretación comprensiva de los procesos del desarrollo, con énfasis en los cambios en las relaciones órganos-órganos, órganos-organismo y

## Introducción

organismo-ambiente (Balon, 2002). Estos cambios en las relaciones a diferentes niveles de organización en el individuo tienen consecuencias en su interacción con el ambiente y representan transiciones morfofuncionales y ecológicas, que son eventos críticos para su supervivencia. La descripción del desarrollo embrionario de *S. annulatus* bajo el enfoque de la teoría del desarrollo en saltos contribuye con conocimiento sobre procesos ontogénicos que puede tener aplicación en ecología de peces, biología pesquera y acuicultura.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es realizar una descripción detallada del desarrollo embrionario de *S. annulatus* en el contexto de la teoría del desarrollo en saltos, que sirva como referencia para estudios de biología del desarrollo, enfocados a reconocer las necesidades biológicas de esta especie durante este periodo de vida y a desarrollar técnicas más adecuadas para lograr una alta supervivencia en un esquema de aplicación en acuicultura.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Ontogenia inicial de peces

En peces, la ontogenia es la historia de vida de un individuo que comienza desde la activación y termina con la muerte. Esta historia de vida está comprendida por una secuencia de largos intervalos estabilizados, denominados pasos, separados por umbrales. Los umbrales ocurren como una transición entre pasos y llevan a una nueva interacción órgano-órgano u organismo-ambiente, y, por lo tanto, a un nuevo estado estabilizado (Balon, 1990). Dichos umbrales dependen de la sincronización de los procesos y el desarrollo de las estructuras que permitirán nuevas funciones en el organismo en el nuevo nivel de estabilidad alcanzado. El fallo de la sincronización de procesos que ocurren de manera heterocrónica tiene consecuencias fatales para el desarrollo de los embriones (Kováč, 2002).

Dentro de la teoría del desarrollo en saltos se propone una clasificación jerarquizada de los intervalos que ocurren en la ontogenia de los peces, que organizados de mayor a menor son: periodos, fases, pasos y estadios. Con base en esta clasificación, y como consecuencia de la cantidad y el tipo de recursos energéticos invertidos en la reproducción, en los peces se reconocen tres tipos básicos de ontogenia: la ontogenia indirecta, que presenta un periodo larvario; la ontogenia de transición, que presenta el periodo de alevín; y la ontogenia directa, en la que no existe un periodo de transición entre embrión y juvenil (Balon, 1990).

En la ontogenia indirecta, la cantidad limitada de nutrimentos endógenos durante el desarrollo embrionario, tiene como consecuencia un estado de desarrollo fisiológico y anatómico menos avanzado (la larva), que requiere necesariamente de una alimentación exógena para alcanzar el fenotipo de un juvenil. Por consiguiente, ese tipo de ontogenia está comprendida por los periodos embrión, larva, juvenil, adulto y senectud. El periodo embrión está formado a su vez por las fases de segmentación, embrión y eleuteroembrión, mientras que el periodo larvario por las fases apterolarva y pterolarva. Los periodos restantes no presentan fases. En contraste, la ontogenia directa se presenta en aquellos organismos que invierten gran cantidad de nutrientes para el desarrollo embrionario y alcanzar el fenotipo juvenil sin presentar periodo larval (metamorfosis). Este tipo de ontogenia presenta los periodos embrión, juvenil, adulto y senectud. El periodo embrionario se divide en la fase de segmentación, embrión y embrión libre. Los periodos restantes no presentan fases (Balon, 1986). Por último, los organismos con ontogenia transitoria presentan los periodos embrión, alevín, juvenil, adulto y senectud. En este último tipo de ontogenia, el periodo alevín presenta la fase

alevín y el periodo juvenil las fases parr, smolt y juvenil (para salmónidos anádromos) (Balon, 1990).

## **2.2. Generalidades biológicas de *S. annulatus***

### **2.2.1. Ciclo de vida (autoecología)**

A pesar de la importancia biológica y económica de *S. annulatus*, en la actualidad se tiene poca información acerca de su historia de vida. No existe información sobre la relación edad y crecimiento en esta especie; sin embargo, de acuerdo a sus longitudes máximas reportadas, *S. annulatus* puede llegar a medir entre 44 y 48 cm (Sánchez-Cárdenas, 2007) y presenta un crecimiento isométrico en los juveniles y adultos (Castellanos-Rodríguez *et al.*, 1982 citado por Sánchez-Cárdenas 2007). Esta especie presenta gran capacidad osmorreguladora desde inicios de su periodo larvario (Álvarez-Rubio *et al.*, 1984), lo que le permite soportar altas variaciones de salinidad. De debido a esto, su estancia dentro de las lagunas costeras, aparentemente se relaciona con la edad y la talla. Los ejemplares más jóvenes permanecen en los sistemas mixohalinos durante cierto tiempo y después emigran hacia la zona nerítica adyacente, sobre todo en fondos con arena y lodo, aunque pueden volver a penetrar hacia las áreas estuarino-lagunares (Castro-Aguirre *et al.*, 1999).

### **2.2.2. Reproducción**

*S. annulatus* presenta un patrón sexual dioico, sin dimorfismo sexual y maduración gonadal asincrónica (Sánchez-Cárdenas *et al.*, 2011). La talla de primera madurez sexual en ambos sexos se alcanza a los 28 cm de longitud total (Sánchez-Cárdenas *et al.*, 2011). Esta especie desova durante la época cálida, cuando la temperatura superficial del mar se encuentra entre los 24.7 a 30.4 °C, y un fotoperiodo de 12.6 a 13.5 horas luz (Sánchez-Cárdenas *et al.*, 2011). A la fecha, se desconoce la conducta reproductiva y el sustrato de desove de *S. annulatus*. Sin embargo, debido a que los huevos son esféricos, adhesivos y demersales (Abdo-de la Parra *et al.*, 2010), se sabe que esta especie es esparcidora de huevos y que éstos quedan adheridos a algún sustrato, probablemente rocoso, y que no presentan cuidado parental (Sánchez-Cárdenas, 2007).

### **2.2.3. Alimentación**

Esta especie es carnívora y depreda principalmente organismos bentónicos. Su dieta incluye moluscos bivalvos (*Crassostrea cortiziensis* y *Dosinia ponderosa*), gasterópodos (*Odostomia* spp.), crustáceos decápodos (*Callinectes* spp., *Panopeus* spp., *Tetrargrapsus jouyi* y *Litopenaeus* spp.), anfípodos (*Corophium acherusicum* y *Ampithoe* spp.), poliquetos (*Nereis* spp. y *Ophelia* spp.) y en menor cantidad consume peces y corales (Stuardo y Martínez, 1974; Maeda-Martínez, 1981; Amezcua-Linares, 1996 citado en Sánchez-Cárdenas, 2007).

### **2.3. Estudios sobre la producción de *S. annulatus* en cautiverio**

Desde 1996 se inició un programa de investigación en el Centro de Investigación de Alimentación y Desarrollo (CIAD) para el desarrollo de la tecnología de cultivo de *S. annulatus* (Abdo-de la Parra *et al.*, 2013). Los estudios abordaron la reproducción en cautiverio e inducción al desove mediante terapias hormonales (Duncan *et al.*, 2003), calidad de huevos (Martínez-Chávez *et al.*, 2003), tolerancia de los embriones al efecto de factores ambientales (Abdo-de la Parra *et al.*, 2012), desinfección de embriones y eliminación de la capa adherente de los huevos (Rodríguez-Ibarra *et al.*, 2010), técnicas de cría larvaria y nutrición (García-Ortega *et al.*, 2003), entre otros. Estos estudios hicieron posible establecer protocolos de cultivo a escala experimental. Sin embargo, no abordaron los trabajos relacionados con aspectos del desarrollo embrionario, morfogénesis y organogénesis, con excepción del de García-Gasca *et al.*, (2006), en el que abordaron el desarrollo del sistema digestivo y la expresión de enzimas digestivas.

### **2.4. Estudios sobre ontogenia inicial en Tetradontidae**

La familia Tetradontidae es una de las más derivadas en términos evolutivos dentro de la clase Osteichthyes (Nelson *et al.*, 2016). Debido a sus especializaciones adaptativas, varias especies de esta familia han sido usadas como modelos para el estudio de la biología del desarrollo en vertebrados (Uji *et al.*, 2011; Zaucker *et al.*, 2014). Paralelamente, los estudios de biología del desarrollo en esta familia se han enfocado a especies de alto valor comercial para desarrollar tecnologías de cultivo (Jang *et al.*, 1996) o proporcionar conocimiento para mejorar el manejo pesquero. Descripciones morfológicas y anatómicas propias del desarrollo de los huevos, larvas

## Antecedentes

y juveniles de *Takifugu chrysops*, *T. obscurus* y *Canthigaster rivulata* fueron realizadas por Fujita y Shinoara (1985), Arai y Fujita (1987), Jang *et al.*, (1996), respectivamente.

Chen (2005) describió el desarrollo embrionario de *Takifugu ocellatus* para complementar los conocimientos sobre fertilización, reproducción y larvicultura de dicha especie. Uji *et al.*, (2011) describieron el desarrollo embrionario de *Takifugu rubripes*, con énfasis en el uso de esta especie como modelo biológico para la comprensión y el análisis de la expresión génica. Estos autores estudiaron el papel que juegan distintos genes y su expresión durante el desarrollo, y realizaron un análisis comparativo con *Danio rerio* y *Oryzias latipes*, con el propósito de clarificar alguna diferencias o similitudes en los dominios de expresión. Por su parte, Zaucker *et al.*, (2014) describieron el desarrollo embrionario de *Tetraodon nigroviridis* y discutieron la conveniencia de esta especie como modelo biológico al compararla con el desarrollo de *D. rerio* y *O. latipes*.

Cómo se mencionó, *S. annulatus* es una especie con alto potencial para su explotación acuícola, por lo que Martínez-Palacios *et al.*, (2002) realizaron la descripción de algunos aspectos generales del desarrollo del huevo, larva y juvenil de *S. annulatus*; sin embargo, la información proporcionada sobre el desarrollo embrionario en ese estudio es limitada y contradictoria.

La información disponible sobre el desarrollo embrionario *S. annulatus* no es suficiente para comprender los cambios morfofisiológicos que ocurren durante el periodo embrionario. Esto se convierte en una limitación para el desarrollo de mejores protocolos de incubación y cultivo de *S. annulatus*. Por lo anterior, en el presente trabajo se propone la descripción de las transiciones morfofuncionales que permitirán identificar requerimientos biológicos en los momentos más críticos del desarrollo. Esta información puede ser útil para la interpretación de procesos ecológicos y para el desarrollo de mejores protocolos para el manejo de embriones en cultivo.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La descripción del desarrollo temprano de *Sphoeroides annulatus* realizada por Martínez-Palacios *et al.*, (2002) incluyó una primera descripción del desarrollo embrionario para esta especie. Los resultados de ese trabajo permitieron reconocer cambios morfológicos generales que suceden en *S. annulatus*. Sin embargo, dicho trabajo está limitado a un esquema gradualista del desarrollo, por lo tanto, no proporciona información detallada de los procesos que ocurren en los intervalos ontogénicos mínimos (pasos), información necesaria para el reconocimiento de requerimientos biológicos a partir de los cambios en las relaciones órgano-órgano, órgano-organismo y organismo-ambiente.

Esta información es de utilidad como una referencia y complemento en estudios relacionados con la biología del desarrollo de esta especie, dentro de las disciplinas de la genómica funcional, biología molecular, toxicología, ecología, biología evolutiva y en aplicaciones acuícolas.

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuáles son los cambios morfofuncionales que ocurren durante el período embrionario de *Sphoeroides annulatus*, que permitan determinar la transición de un paso estabilizado a otro?

#### 5. OBJETIVOS

##### 5.1. General

Describir los pasos que constituyen el periodo embrionario de *Sphoeroides annulatus* mediante una aproximación morfológica, anatómica y conductual.

##### 5.2. Particulares

- a) Describir los cambios morfológicos ocurridos en el periodo embrión.
- b) Registrar la variación del ritmo cardiaco durante el periodo embrión.
- c) Describir los movimientos morfogenéticos ocurridos durante el periodo embrión.
- d) Describir histológicamente el desarrollo de los órganos en los embriones.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Obtención de material biológico

Quince adultos maduros de *Sphoeroides annulatus* ( 6 hembras,  $882 \pm 174$  g; 9 machos,  $866 \pm 321$  g) fueron obtenidos vivos de la captura comercial del campo pesquero Playa Norte, en Mazatlán, Sinaloa. Los peces fueron trasladados a las instalaciones de la planta piloto de peces marinos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Unidad Mazatlán. Éstos fueron colocados en un tanque de 5,000 L que operó como sistema abierto de flujo continuo ( $34 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ) con aireación ( $60 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Las condiciones ambientales no fueron controladas y los parámetros de calidad de agua y de manejo zootécnico se mantuvieron en los siguientes valores: temperatura,  $26^\circ\text{C}$ ; salinidad,  $35 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{O}_2$ ,  $6 \text{ mg L}^{-1}$ ; proporción sexual, 0.6:1 hembras:machos; y biomasa,  $2.6 \text{ kg m}^3$ . Los peces se mantuvieron sin alimentar por dos días y posteriormente se seleccionaron para la inducción a la maduración final con tratamiento hormonal. Para esto, primero los peces fueron anestesiados ( $0.25 \text{ ml L}^{-1}$  de 2-fenoxietanol al 99%; P1126, Aldrich, solubilizado en 3 ml de alcohol etílico al 95%) uno por uno hasta alcanzar el estado de anestesia profunda. A cada pez se le realizó presión abdominal para intentar extraer esperma. Si no expelió esperma, entonces se procedió a tomar una biopsia ovárica para confirmar que el espécimen fue hembra y el estado de desarrollo de los oocitos. Las hembras con oocitos mayores a  $450 \mu\text{m}$  fueron seleccionadas para el tratamiento hormonal. A dos machos y dos hembras se les aplicó una única inyección intraperitoneal ( $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  a los machos y  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  a las hembras) de un análogo sintético de la hormona liberadora de gonadotropina ([des-Gly<sup>10</sup>, D-Ala<sup>6</sup>] LHRHa, L4513, Sigma) disuelta en solución fisiológica. Después de 48 h de la inyección, se observó distensión abdominal en las hembras, lo cual indicó el estado de ovulación y la posibilidad de realizar la fertilización *in vitro*. Primero, se anestesiaron los machos como se indicó anteriormente y mediante presión abdominal se les extrajo el esperma, que fue recolectado con una jeringa de insulina sin aguja. Se tuvo cuidado de no contaminar el esperma con agua u orina de los peces para evitar la activación de los espermatozoides. Después se anestesiaron a las hembras de la misma forma que a los machos. Se les extrajeron los óvulos mediante un masaje abdominal y fueron depositados en un recipiente de plástico seco. Una vez extraídos todos los huevos de una hembra, se pesaron para determinar su número mediante el factor de conversión de  $3500 \text{ huevos g}^{-1}$ . Posteriormente, se realizó la fertilización *in vitro* con la técnica húmeda, agregando una enzima proteolítica para eliminar la capa adherente de los huevos de acuerdo con el protocolo descrito por Rodríguez-Ibarra *et al.*, (2010). Después de confirmar la

pérdida de la adherencia de los huevos, que ocurrió a los 10 min aproximadamente, los huevos fueron enjuagados con agua marina esterilizada con radiación UV y colocados en una incubadora. La incubadora fue un tanque cilindro-cónico de 120 L y en éste se mantuvo un flujo continuo de 0.5 L min<sup>-1</sup> de agua de mar y aireación a un flujo de 1 L min<sup>-1</sup>. La densidad de incubación fue de 3843 embriones por litro y las condiciones de incubación fueron las siguientes: 26 ± 0.3 °C; pH 8; salinidad, 35 g L<sup>-1</sup>; fotoperiodo natural; O<sub>2</sub>, 7 mg L<sup>-1</sup>. El agua marina que se utilizó durante la incubación fue previamente filtrada a 1 µm de retención relativa, desinfectada con cloro al 5% (1 ml por litro de agua) y neutralizada con tiosulfato de sodio (0.2 g L<sup>-1</sup>).

### **6.2. Toma de muestras, fijación, fotodocumentación, videodocumentación y medición**

El programa de toma de muestra se basó en las recomendaciones de Balon y Fleger-Balon (1985) y se ejecutó de acuerdo a la velocidad del progreso del desarrollo. Esto exigió una toma de muestra cada 10 min durante las primeras 6 h, que se extendió progresivamente en 20, 40, 60, 120, 240 y 360 min. En cada toma de muestra se tomaron de 6 a 15 especímenes para fotodocumentación, de 10 a 15 para videodocumentación, y 50 para fijación. Previamente a la fotodocumentación y la fijación, los especímenes se anestesiaron en una solución de 2-fenoxietanol al 2%. La fijación se realizó en formalina al 10% neutralizada con fosfatos o en solución Davidson. Después de 72 h de fijación, los especímenes se transfirieron a alcohol etílico al 70%.

La toma de fotomicrografías se realizó con un microscopio Olympus® modelo BX-41 equipado con una cámara Olympus® modelo DP27 y el software cellSens de Olympus®. Antes de que los embriones eclosionaran, se colocaron en un portaobjetos. Cada uno de ellos fue fotografiado en distintos ángulos. Una vez que se detectaron los primeros movimientos musculares y latidos del corazón se tomaron videos de un minuto. Para la determinar el ritmo cardiaco se registró el número de latidos por minuto. Después de la eclosión, la toma de fotomicrografías se realizó con un estereoscopio Motic® modelo SMZ-171. Se usó la misma cámara y el software mencionados anteriormente.

Las fotomicrografías fueron usadas para la descripción morfológica del desarrollo embrionario y la obtención de mediciones morfométricas con el software SigmaScan. Las mediciones morfométricas incluyeron la medición del diámetro del huevo y de la longitud notocordal.

### 6.3. Procesamiento histológico

El procesamiento histológico se realizó en el Laboratorio de Histología de la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

Para la obtención de preparaciones histológicas se usaron las muestras fijadas en solución Davidson y conservadas en alcohol al 70%. Primero, los especímenes se retiraron de la solución de alcohol y fueron colocados dentro de pequeñas bolsas de papel filtro, que fueron colocadas en cassetes (contenedor de plástico). Las muestras pasaron por un proceso de deshidratación mediante la exposición a concentraciones crecientes de isopropanol. Posteriormente se expusieron a un agente aclarante (aceite mineral) y por último se sometieron a impregnación en parafina líquida (Buesa & Peshkov, 2009). Los tiempos de deshidratación, aclarado e impregnación en parafina fueron previamente ajustados específicamente para los embriones objeto de estudio, a partir de tres procesos de prueba y la evaluación de la calidad de los cortes histológicos (Sánchez-Cárdenas, com. pers.) (Tabla 1).

**Tabla 1. Reactivos y tiempos de inmersión de la técnica histológica de deshidratación, aclarado e impregnación en parafina (Buesa & Peshkov, 2009).**

Reactivo	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Alcohol etílico 70%	35	60
Alcohol etílico 80%	35	60
Alcohol etílico 96%	35	60
Isopropanol 95%	35	60
Isopropanol 100%	35	60
Isopropanol: aceite mineral	50	90
Isopropanol: aceite mineral	50	90
Aceite mineral	50	30
Aceite mineral	50	30
Parafina	60-65	45
Parafina	60-65	60
Parafina	60-65	120

Después de terminar el proceso de deshidratación, los embriones fueron colocados en moldes para su inclusión en parafina. Los moldes obtenidos,

## Materiales y métodos

correctamente etiquetados, se dejaron enfriar. Una vez que la parafina se solidificó, los bloques fueron extraídos y seccionados a 4 µm de espesor con ayuda de un micrótopo rotatorio semiautomático. Los embriones fueron seccionados completamente, de manera que de cada bloque se obtuvo una serie de cortes a diferentes niveles del cuerpo de los embriones. Los cortes obtenidos se colocaron en un baño de flotación a 35 o 45°C para extenderlos. Ya extendidos, estos fueron recuperados con un portaobjetos debidamente rotulado y fueron secados a temperatura ambiente. Posteriormente, las laminillas fueron colocadas en una estufa a 70 °C durante 24 horas, con la finalidad de eliminar parafina. Después las laminillas fueron sometidas a las técnicas de tinción de Hematoxilina-Eosina (Muñetón-Gómez *et al.*, 2000) y Tetracrómica-VOF Tipo III-G.S (Sarasquete y Gutiérrez, 2005). Los procedimientos de tinción de la técnica de Hematoxilina-Eosina y Tetracrómica-VOF Tipo III-G.S se presentan en las tablas 2 y 3, respectivamente. Finalmente se realizó el montaje de las laminillas utilizando una resina sintética (cytoseal) para su conservación y posterior análisis mediante microscopía óptica.

**Tabla 2. Técnica de tinción Hematoxilina-Eosina con xileno (Muñetón-Gómez *et al.*, 2000).**

Reactivos	Tiempo
Xileno	6 minutos
Xileno	6 minutos
Xileno	6 minutos
Alcohol 100%	20 segundos
Alcohol 100%	20 segundos
Alcohol 95%	20 segundos
Alcohol 80%	20 segundos
Agua corriente	1 minuto
Hematoxilina	5 minutos
Agua corriente	1 minuto
Alcohol ácido	3 segundos
Agua corriente	2 minutos
Agua amoniacal	1 minuto
Agua corriente	3 minutos
Alcohol 80%	30 segundos
Eosina	3 minutos
Alcohol 95%	20 segundos
Alcohol 100%	20 segundos

## Materiales y métodos

Alcohol 100%	40 segundos
Alcohol 100%	40 segundos
Citrisolv	1 minuto
Citrisolv	1 minuto
Citrisolv	1 minuto

**Tabla 3. Técnica de tinción tetracrómica-VOF Tipo III-G.S (Sarasquete y Gutiérrez, 2005).**

<b>Reactivo</b>	<b>Tiempo</b>
Xileno	6 minutos
Xileno	6 minutos
Xileno	6 minutos
Alcohol 100%	20 segundos
Alcohol 100%	20 segundos
Alcohol 95%	20 segundos
Alcohol 80%	20 segundos
Agua corriente	1 minuto
Hematoxilina	5 minutos
Agua corriente	1 minuto
Alcohol ácido	4 segundos
Agua corriente	2 minutos
Agua amoniacal	1 minuto
Agua corriente	3 minutos
VOF	2 minutos
Alcohol 80%	20 segundos
Alcohol 100%	20 segundos
Alcohol 100%	40 segundos
Citrisolv	1 minuto
Citrisolv	1 minuto
Citrisolv	1 minuto

### 6.4. Descripción de la ontogenia inicial

En el presente trabajo se utilizó la terminología y el modelo jerarquizado de los intervalos del desarrollo propuesta por Balon (1990) modificada por Martínez-Brown (2012) para el periodo embrionario. Siguiendo este esquema, el periodo de embrión se divide en tres fases: segmentación, organogénesis y eleuteroembrión. Cada una de las fases estuvo integrada por pasos, los cuales representan la unidad del desarrollo en la

## Materiales y métodos

que el individuo mantiene una dinámica interna estabilizada y en coherencia funcional con el ambiente externo, como se describió en la sección de antecedentes. Los estadios son momentos instantáneos en la observación del progreso del desarrollo, por lo que no representan un intervalo o un proceso ontogénico, sino la unidad de observación y recolección de datos del desarrollo que usa para la reconstrucción e interpretación de los pasos. Para nombrar un estadio se utilizan características morfológicas conspicuas, de fácil reconocimiento (p. ej., Shardo, 1995). Para nombrar los pasos se le designa una letra, que en el caso del periodo de embrión es *E*, un número consecutivo en el orden de la progresión del desarrollo y una característica distintiva del paso (p.ej., Kováč, 2000). Por ejemplo, *E3 Segmentación del blastodisco* sería el paso tres del periodo embrión y lo que caracteriza al paso es la segmentación del blastodisco.

La descripción de las estructuras anatómicas e histológicas del periodo embrión se realizó con base en la terminología utilizada por Lentz y Trinkaus (1967), Kimmel *et al.* (1995) y Uji *et al.* (2011). Para descripción de la segmentación del blastodisco, origen de las capas germinales, movimientos celulares, origen de la capa sincitial vitelina y de algunas estructuras se basó en trabajos realizados Trinkaus y Lentz (1967), Warga y Kimmel (1990), Trinkaus (1993) y Kunz (2004). Shardo (1995) para la descripción del desarrollo las capas celulares del blastodermo y la neurulación. La descripción de la organogénesis se realizó con base a las descripciones hechas por O'Connell (1981) para el desarrollo de la piel, Hall *et al.*, (2004) y Tsai *et al.*, (2013) para la descripción de la neurulación, el desarrollo del cerebro y la masa muscular, Avanesov y Malicky (2004) para el desarrollo de los ojos, Chen *et al.*, (2006) y Morrison *et al.*, (2001) para el desarrollo del sistema digestivo.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Periodo embrión

El periodo embrión de *Sphoeroides annulatus* inició con la activación y finalizó con el inicio de la alimentación mixta (4 d, 16 h). Este periodo es compuesto por 9 pasos.

#### 7.1.1. Fase de segmentación

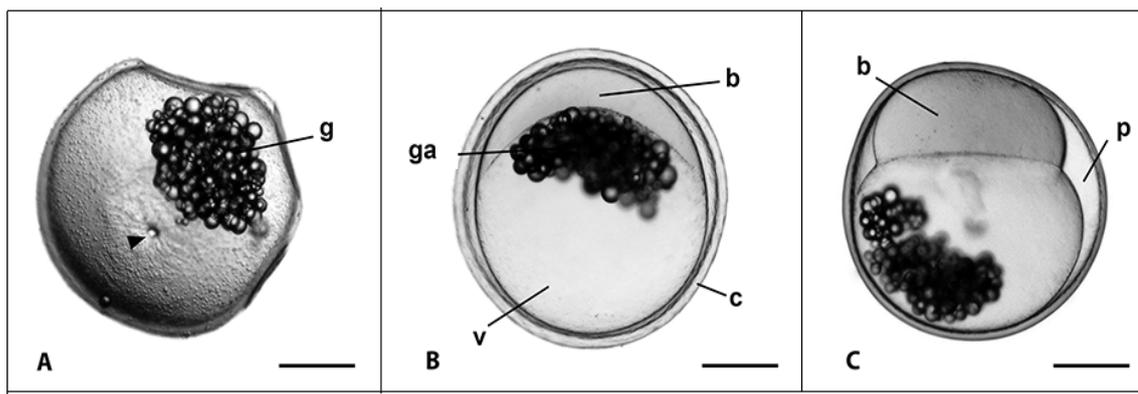
##### 7.1.1.1. Paso E1, Activación

El paso de activación dio inicio con la fertilización (contacto de los óvulos con el agua) y finalizó con la primera división del blastodisco (1 h, 10 min). Antes del inicio de la activación, los óvulos fueron esferoidales, opacos, con corión flácido y con flotabilidad negativa (fig. 1A). Los óvulos presentaron gran cantidad de glóbulos de aceite esféricos y de distintos tamaños, que individualmente fueron de color dorado y translúcidos, pero en conjunto se tornaron opacos y flotaron libremente dentro del vitelo. El diámetro promedio del huevo fue de  $684 \pm 34 \mu\text{m}$  y no incrementó significativamente después de la activación.

Posterior al inicio de la activación (después del contacto con el agua), los huevos se volvieron transparentes. El estadio de diferenciación bipolar (14 min) inició con la formación del espacio perivitelino y el blastodisco, simultáneamente su envoltura externa (corion) empezó a engrosar (fig. 1B).

En el estadio de 1 célula (47 min), el espacio perivitelino se hace aún más notable y el blastodisco se ubicó en contraposición a los glóbulos de aceite al final de la activación, y en su parte inferior, estuvo en contacto con el córtex, una capa citoplasmática que envuelve al vitelo completamente (fig. 1C).

## Resultados



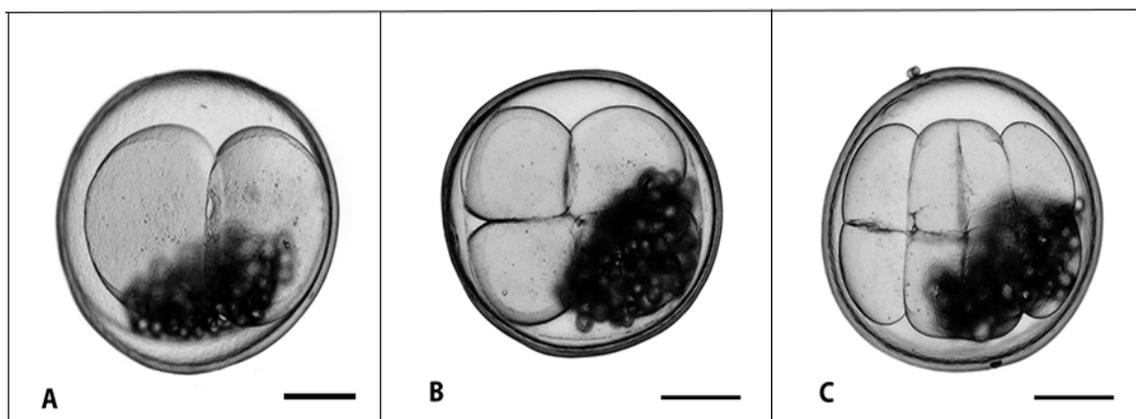
**Figura 1.** Estadios representativos del paso E1, Activación. **A)** estadio óvulo, se observa el micrópilo (▲) y los glóbulos aceite; la discontinuidad de la esfericidad indica la flacidez del corión. **B)** embrión en vista lateral en el estadio de diferenciación bipolar. **C)** embrión en vista lateral en estadio 1 célula. Escalas: 200  $\mu\text{m}$ . b = blastodisco, c = corion, g = glóbulos de aceite, p = espacio perivitelino, v= vitelo.

### 7.1.1.2. Paso E2. Segmentación del blastodisco

Este paso inició con la división del blastodisco (1 h, 10 min) y finalizó con la transformación del blastodisco a estereoblástula (2 h, 52 min). Las primeras seis divisiones mitóticas (segmentaciones del blastodisco) ocurrieron de manera sincronizada en lapsos de alrededor de 20 minutos, y posterior a éstas, sucedieron asincrónicamente. Las formas, tamaños y número de blastómeros variaron conforme las divisiones transcurrían. Cada estadio fue nombrado con base en el número de blastómeros resultantes de cada división del blastodisco.

La primera división (estadio 2 células [1 h, 10 min]) ocurrió en la zona central del blastodisco y originó dos blastómeros que presentaron tamaño y forma similar (fig. 2.1A). En el estadio 4 células [1 h, 37 min], la segunda división se dio perpendicular a la primera y produjo cuatro blastómeros de tamaño similar. En aquellas partes dónde los blastómeros mantuvieron contacto entre sus membranas, presentaron un ángulo recto, mientras que sus márgenes donde no se dio dicho contacto, tomaron forma del arco de una elipse (figura 2.1B). En el estadio 8 células [1 h, 38 min], la división que originó dicha cantidad de blastómeros, ocurrió en dirección paralela a la primera división. De los blastómeros originados, cuatro se presentaron en posición central con formas casi rectangulares y cuatro distales que presentaron mayor tamaño y en resultado de su contacto con las centrales presentaron forma de sector circular con ángulo recto (fig. 2.1C).

## Resultados

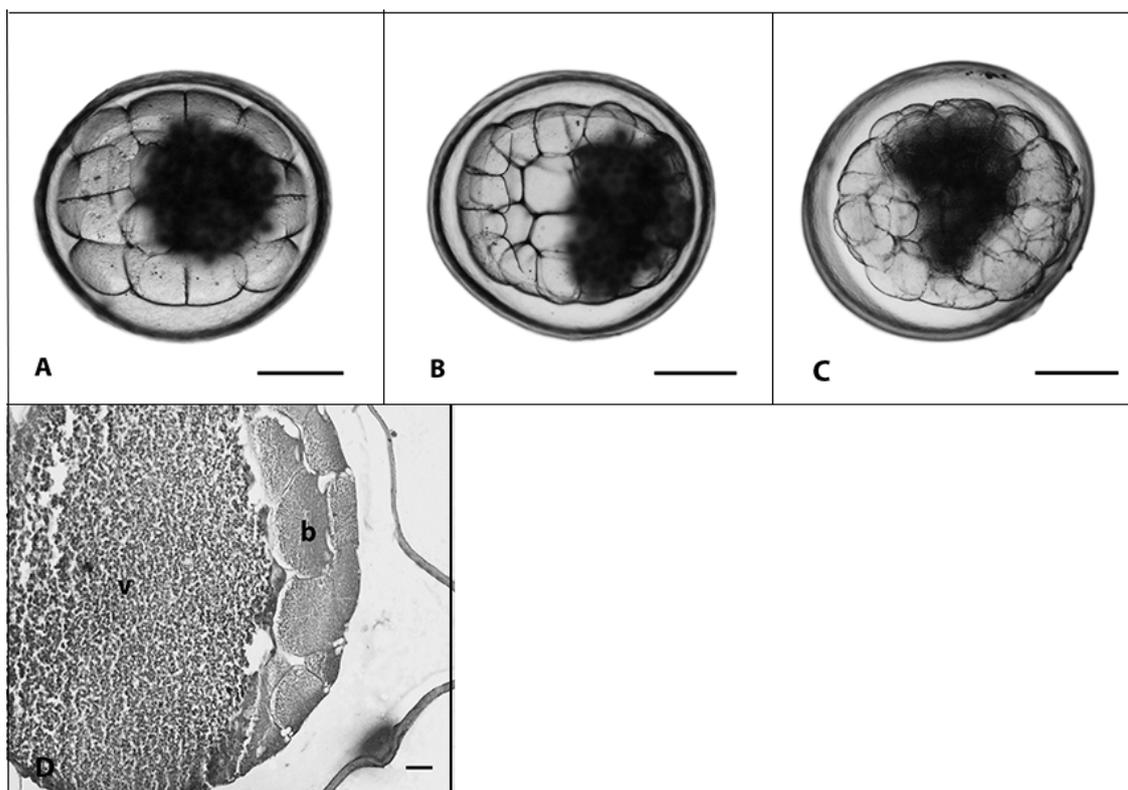


**Figura 2.1.** Estadios representativos del paso E2, Segmentación del blastodisco. **A)** embrión en estadio de 2 células. **B)** embrión en el estadio de 4 células. **C)** embrión en el estadio de 8 células. Escalas: 200  $\mu\text{m}$ .

La cuarta división del blastodisco originó 16 blastómeros (estadio 16 células [2 h, 08 min]), ésta fue en dirección perpendicular a la primera y resultaron cuatro blastómeros centrales y 12 periféricos (fig. 2.2A). La forma y tamaño que se presentaron entre ellos no fue similar. El estadio 32 células fue originado por la quinta división [2 h, 34 min]), que ocurrió en dirección paralela a la primera. A partir de este estadio fue complicado reconocer el número de células centrales y periféricas por efecto de la posición de los glóbulos de aceite que no permitieron realizar esta distinción (fig. 2.2B).

En el estadio 64 células (2 h, 52 min) el blastodisco presentó un orden celular distribuido en dos capas. Los blastómeros presentaron formas poliédricas por el contacto y presión que existió entre sus membranas (fig. 2.2C). A partir de este estadio los intervalos de segmentación fueron asincrónicos y los glóbulos de aceite, así como el tamaño de los blastómeros no permitía realizar la cuenta de estos por lo que, los números que se designaron para los siguientes estadios son sólo de carácter nominal tomando en cuenta el resultado de blastómeros por efecto de la división celular por mitosis.

## Resultados



**Figura 2.2.** Estadios representativos del paso E2, Segmentación del blastodisco. **A)** Embrión en estadio 16 células. **B)** Embrión en estadio 32 células. **C)** Embrión en estadio 64 células y **D)** sección transversal de embrión en estadio 64 células. Escalas: A), B) y C), 200  $\mu\text{m}$ ; D) = 50  $\mu\text{m}$ . b = blastómeros; v = vitelo.

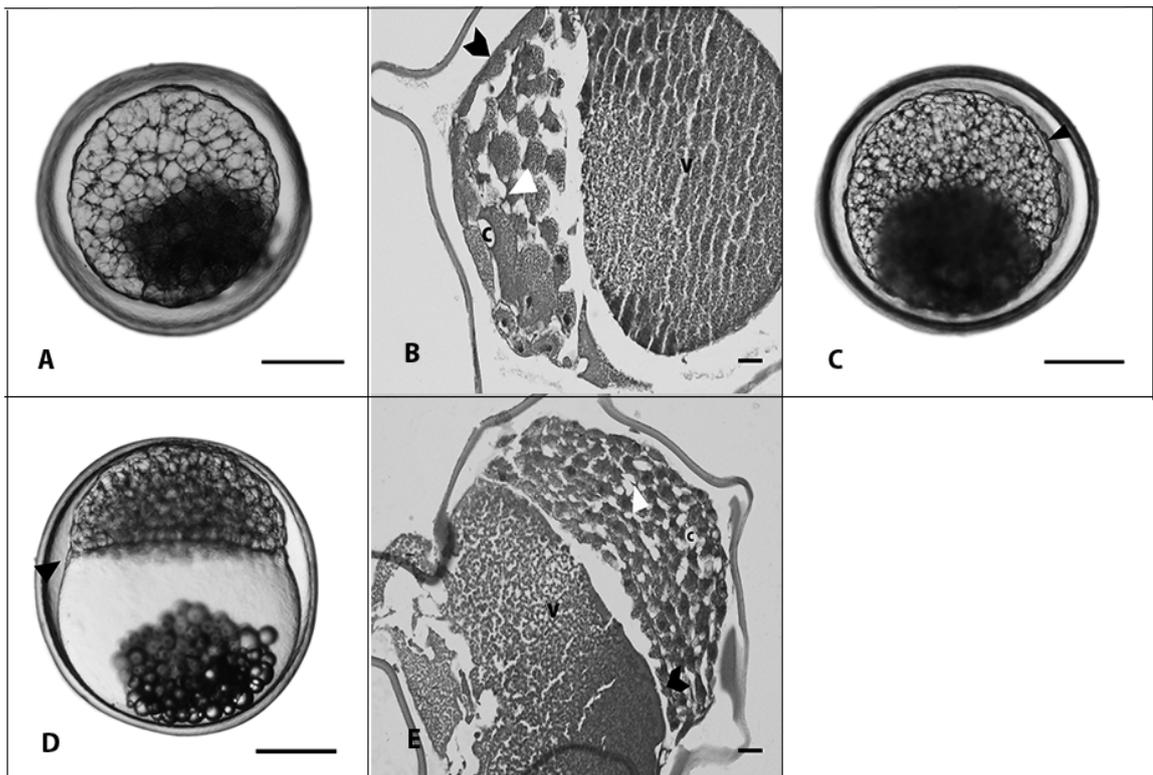
### 7.1.1.3. Paso E3. Estereoblástula

En este paso el blastodisco se transformó a blastodermo por efecto de la formación de las tres capas celulares (3 h, 35 min). Éstas tres capas celulares formadas son: la capa de células envolventes se compone de una sola capa de células aplanadas unidas de manera horizontal y es la capa más externa de las tres, debajo de ésta se encuentra la capa células profundas, o bien, los blastómeros profundos, que se compone de varias capas de células, dichas células variaban en tamaño a lo largo del paso (más pequeñas) conforme las divisiones celulares, y de igual manera en su forma pues, debido al origen prolongaciones citoplasmáticas (filopodios) cada una de ellas tomaron forma irregulares y, producto de las segmentaciones, entre ellas se originaron espacios de diferentes dimensiones (cavidades de segmentación); y la tercera capa es la capa sincitial vitelina que se encuentra entre las capa de células profundas y el vitelo, a través de ella pasan todos los nutrimentos del vitelo por lo que ésta es la que permite la nutrición al embrión. La

## Resultados

extensión de dicha capa sobrepasó los márgenes del blastodermo y se hizo continua al córtex el cual rodea por completo al vitelo. Este paso llegó a su fin con el inicio de la gastrulación (7 h, 20 min).

En el estadio 128 células, (3 h, 35 min) los blastómeros se presentaron de manera compacta, de distintos tamaños y la mayoría de ellos presentaron forma casi circular. El blastodisco presentó forma circular en su contorno debido al orden de las células, dicha forma circular se mantuvo desde este estadio hasta el inicio de la gastrulación. Simultáneamente los blastómeros superficiales empezaron a alargarse, señal del inicio de la formación de la capa de células envolventes y se observaron las cavidades de segmentación. Los blastómeros presentaron filopodios (fig. 3.1A, B). En el estadio fusión de las células marginales (4 h, 13 min), las células que se encuentran en la periferia del blastodermo colapsaron para dar origen a la capa sincitial vitelina la cual se desarrollará por debajo de éste (fig. 3.1C, D). Las células profundas se hacen más pequeñas y de igual manera que en el estadio anterior se aprecian las cavidades de segmentación y los filopodios (fig. 3.1E).



**Figura 3.1.** Estadios representativos del paso E3, Estereoblástula. **A)** estadio de 128 células y **B)** sección transversal, se señala las células más superficiales alargadas (▲) y los filopodios presentes en las células profundas (△). **C)** estadio fusión de las células marginales, **D)** en vista lateral y **E)** sección transversal, se señalan las células con los filopodios (△) y las células que

## Resultados

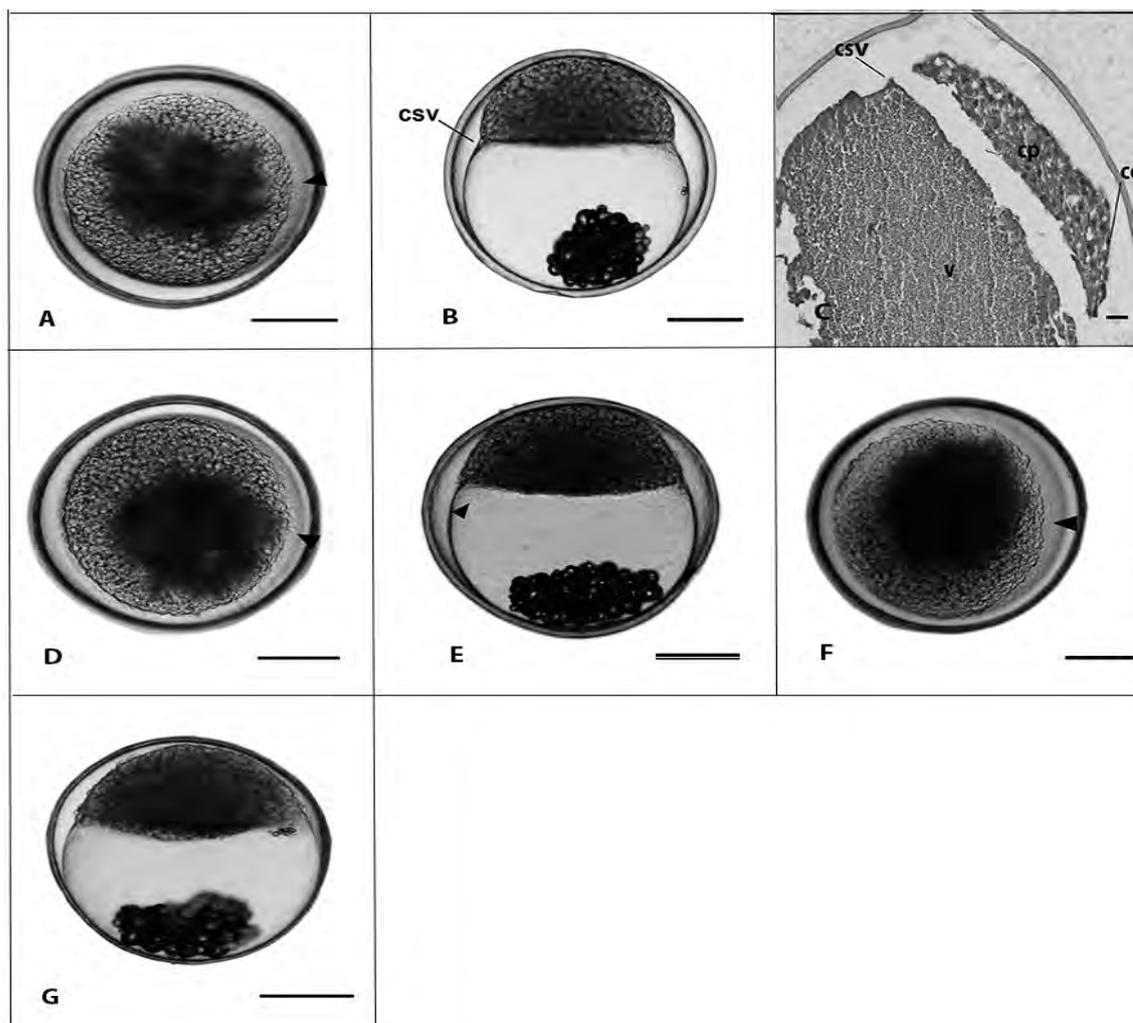
dan origen a la capa sincitial vitelina (A). Escalas: A), C) y D) = 200  $\mu\text{m}$ ; B) y E) = 50  $\mu\text{m}$ . b = blastómeros, c = cavidades de segmentación, v = vitelo.

En el estadio de capa sincitial vitelina externa con 1-2 núcleos (4 h, 46 min), como su nombre lo menciona, se caracterizó por la presencia de uno o dos anillos de núcleos en la misma. La parte inferior del blastodisco tomó forma plana. (fig. 3.2A, B).

En el estadio capa sincitial vitelina externa con 2-3 núcleos (5 h, 55 min) no se pudo hacer la distinción de las células que conformaban el blastodermo, el número de núcleos que componían la capa sincitial vitelina externa aumento por lo que también lo hizo su grosor y la parte inferior del blastodermo tomó una ligera curvatura, ya no era plana como lo fue en el estadio anterior (fig. 3.2D, F)

En el estadio de blastodermo biconvexo (7 h, 20 min) el blastodermo presentó forma biconvexa asimétrica. En este estadio el número de núcleos que compusieron la capa sincitial con respecto al estadio anterior (2-3 núcleos) por lo que no existió diferencias en su grosor (fig. 3.2F, G).

## Resultados



**Figura 3.2.** Estadios representativos del paso E3, Esterereoblástula, **A)** estadio de capa sincitial vitelina 1-2 núcleos, **B)** en vista lateral; nótese los núcleos de la capa sincitial vitelina (▲) y **C)** corte transversal. **D)** estadio de capa sincitial vitelina 2-3 núcleos, y **E)** en vista lateral; nótese el aumento del grosor de la capa sincitial vitelina (▲). **F)** estadio de blastodermo biconvexo, y **G)** en vista lateral, se señala la capa sincitial vitelina (▲). Escalas: A), B), D), E) y F) = 200  $\mu$ m, C) = 50  $\mu$ m. ce = células envolventes, cp = células profundas, csv = capa sincitial vitelina. v = vitelo.

### 7.1.1.4. Paso E4. Gástrula

El paso gástrula inició con un adelgazamiento del blastodermo (8 h, 9 min) que fue por efecto del proceso de epibolia por la formación e involución del hipoblasto que originó el anillo germinal y dicho paso llegó a su fin con el cierre del blastoporo (13 h, 52 min), o bien, el fin del proceso de epibolia donde simultáneamente se formó el eje embrionario. La epibolia es el proceso en el cual el blastodermo se extiende sobre el

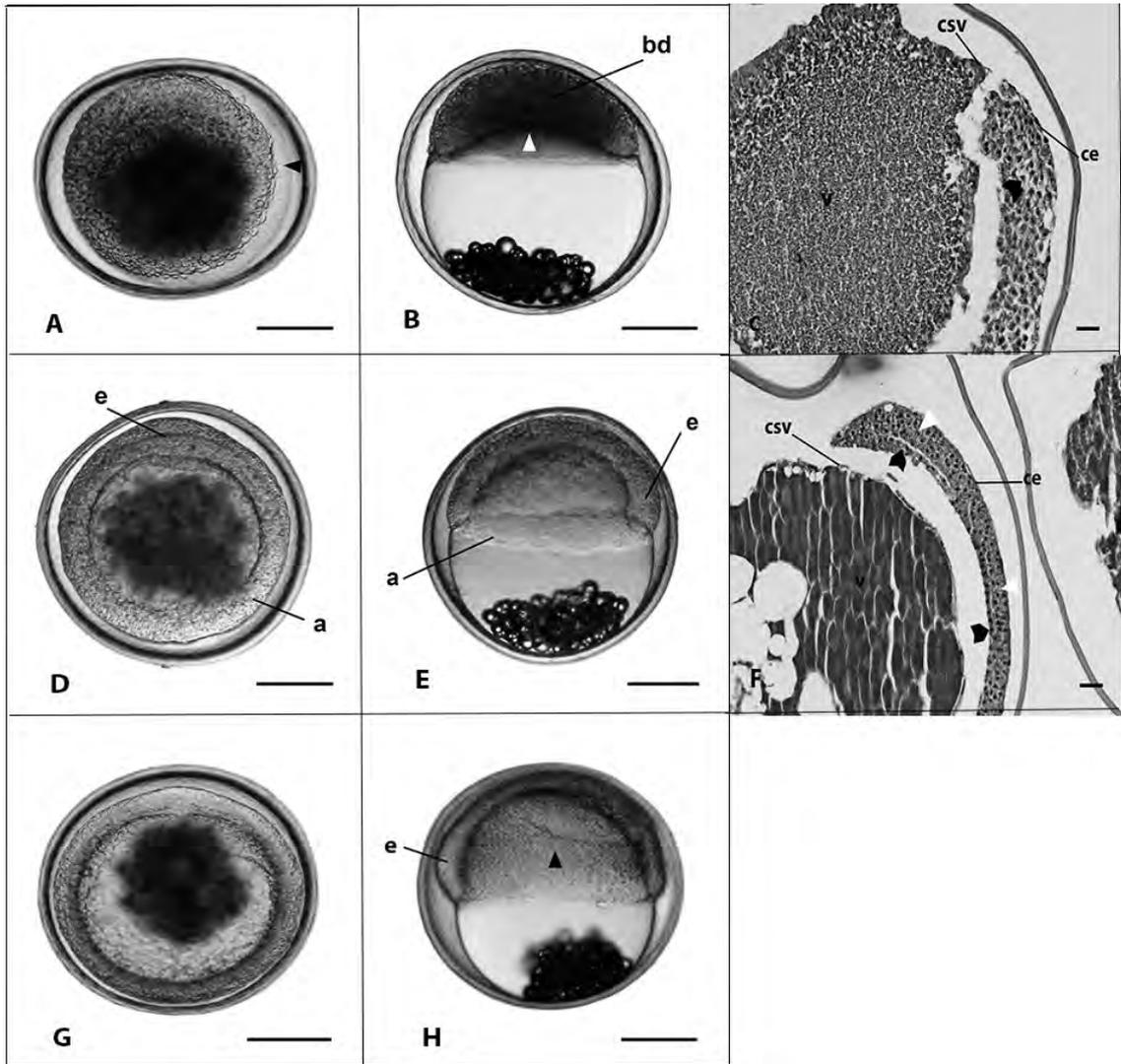
## Resultados

vitelo hasta que este lo cubre totalmente. Los movimientos morfogénicos que dan lugar a distintos procesos y especialización celular ocurrieron a lo largo de este paso. Dichos movimientos son: involución, convergencia, intercalación radial, extensión y especialización de las células que posteriormente se originará la organogénesis. En el estadio domo (8 h, 9 min) el blastodermo disminuyó su grosor y tomó forma cóncava. La capa sincitial vitelina disminuyó su grosor a 1-2 núcleos, por efecto de que los núcleos de la capa sincitial vitelina externa se internalizaban dentro de la capa sincitial vitelina interna (fig. 4.1A, B). Las células de la capa profunda presentaron filopodios aún más alargados para llevar a cabo la locomoción, o bien, ya eran capaces de realizar movimientos celulares (fig. 4.1C).

En el estadio de 40% epibolia (9 h, 12 min) el grosor de los núcleos de capa sincitial vitelina ya no se observa, esto debido a su completa internalización dentro de la capa sincitial vitelina interna (fig. 4.1D, E). Se originaron el hipoblasto y el epiblasto (fig. 4.1F). El hipoblasto, presentó un grosor de una o dos células y se encontró más cercana a la capa sincitial vitelina la cual fue utilizada por las células del como sustrato para realizar sus movimientos. Sobre el hipoblasto, con un grosor de tres o más células, se encontró el epiblasto. El desarrollo del proceso de epibolia y la formación del anillo germinal fue resultado de la involución de las células del hipoblasto. De manera similar, los movimientos de convergencia e involución dieron como resultado el escudo embrionario.

En el estadio 50% epibolia (9 h, 55 min), el hipoblasto sufrió mayor involución, esto fue evidenciado por el aumento de la altura del anillo germinal. Los movimientos de convergencia e intercalación radial dieron como resultado un adelgazamiento del blastodermo su zona central (fig. 4.1G, H).

## Resultados



**Figura 4.1.** Estadios representativos del paso E4, Gástrula. **A)** embrión en estadio domo, **B)** vista lateral; nótese el adelgazamiento del blastodermo (▲) y la disminución del número de núcleos de la capa sincitial vitelina (▲), y **C)** corte transversal, se señalan las células profundas con filopodios (▲). **D)** embrión en estadio epibolia al 40%, **E)** en vista lateral, y **F)** corte transversal, se señalan las células componentes del hipoblasto (▲) y el epiblasto (▲). **G)** embrión en estadio de epibolia al 50%, y **H)** en vista lateral, nótese el incremento de la altura del anillo germinal (▲). Escalas: A) B), D), F), G) y H) = 200 µm; C) y F) = 50 µm. a = anillo germinal, csv = capa sincitial vitelina, ce = capa de células envolventes, ee = escudo embrionario, v = vitelo.

En el estadio 60% epibolia (10 h 54 min), el anillo germinal, al igual que el estadio anterior, sigue aumentado su altura (fig 4.2B). El hipoblasto es de 1-2 células de grosor excepto en la parte dorsal (en el eje antero-posterior del embrión [escudo

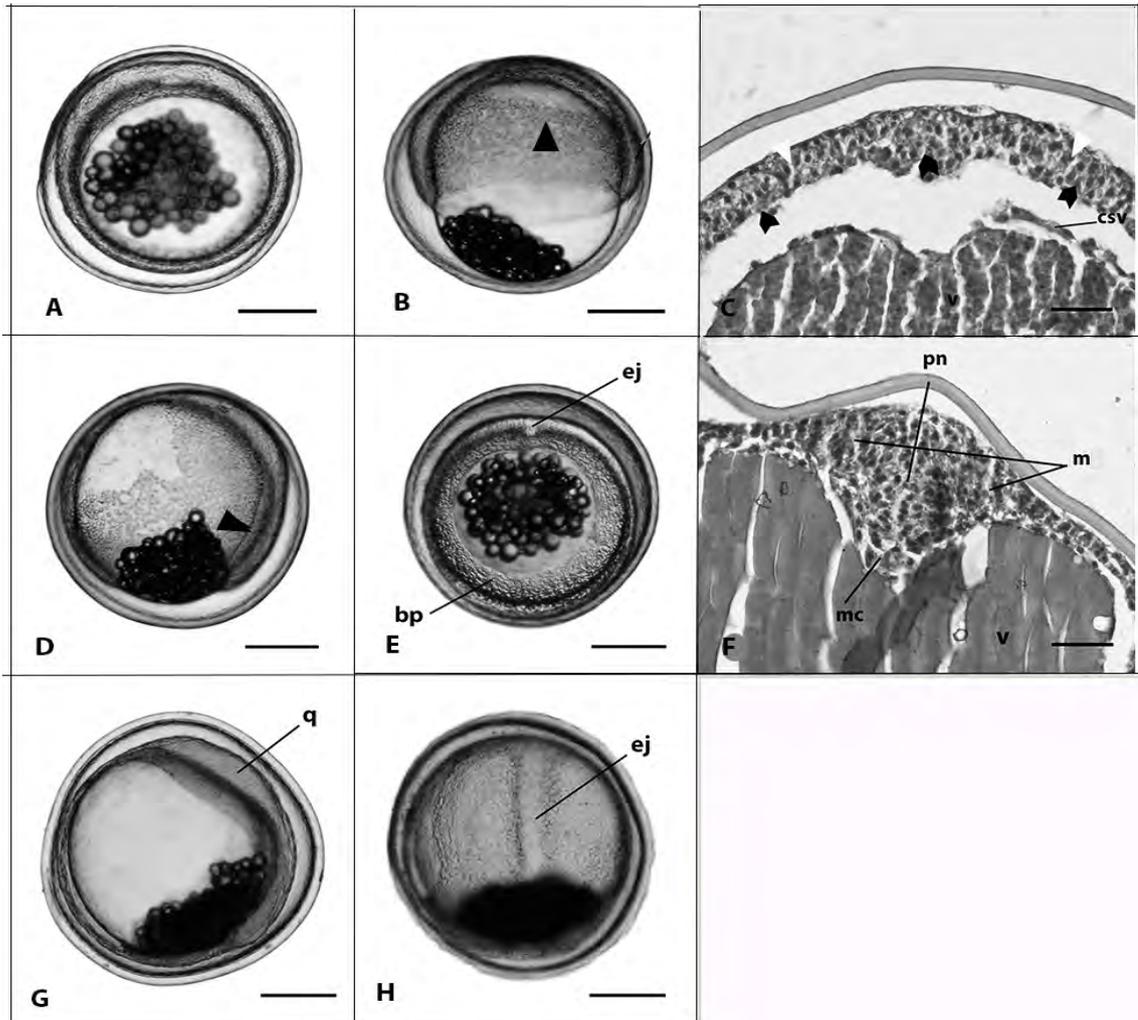
## Resultados

embrionario]), que fue más gruesa que el resto debido al origen del hipoblasto axial (Fig. 4.2C).

En el estadio de 90% epibolia (12 h, 51 min), los movimientos de convergencia y extensión del hipoblasto originan una pequeña extensión en posición antero-posterior, el eje embrionario, la cual se seguirá extendiendo en la misma posición en la que se originó (en vista lateral se observa la placa mesodérmica lateral) (fig. 4.2D). Se distinguen las células de la placa neural que derivaron del epiblasto, debajo de ésta se observó el esbozo del notocordio (mesodermo cordal) y lateralmente a éstas se encontraban las del mesodermo, las cuales originan las somitas, ambos derivados del hipoblasto (fig. 4.2F).

En el estadio del cierre del blastoporo (13 h, 51 min), se observa el eje embrionario ya definido y en la región anterior del embrión se observa la presencia de la quilla neural, originada de la placa neural, lo que indicó el inicio de la neurulación (formación de la región cefálica) (fig. 4.1G, H). En región caudal del eje embrionario, la quilla neural se presentó más delgada y se fue haciendo más gruesa en la parte craneal (fig. 4.2I).

## Resultados



**Figura 4.2.** Estadios representativos del paso E4, Gástrula. **A)** embrión en estadio epibolia al 60%, **B)** en vista lateral, señalado el incremento de altura el anillo germinal (▲) y **C)** corte transversal, se señala el epiblasto (▲) y debajo de éste el engrosamiento del hipoblasto en la parte del eje antero-posterior que da origen al hipoblasto axial (▲). **D)** embrión en estadio de epibolia al 90%, se señala la placa mesodérmica lateral (▲), **E)** en vista ventral y **F)** corte transversal. **G)** embrión en estadio cierre de blastoporo, y **H)** en vista ventral. Escalas: A), B), D), E), G) y H) = 200 µm; C) y F) e I) = 60 µm. bp = blastoporo, cs = capa sincitial vitelina, ej = eje embrionario, m = mesodermo, mc = mesodermo cordal, pn = placa neural, q = quilla neural. v = vitelo.

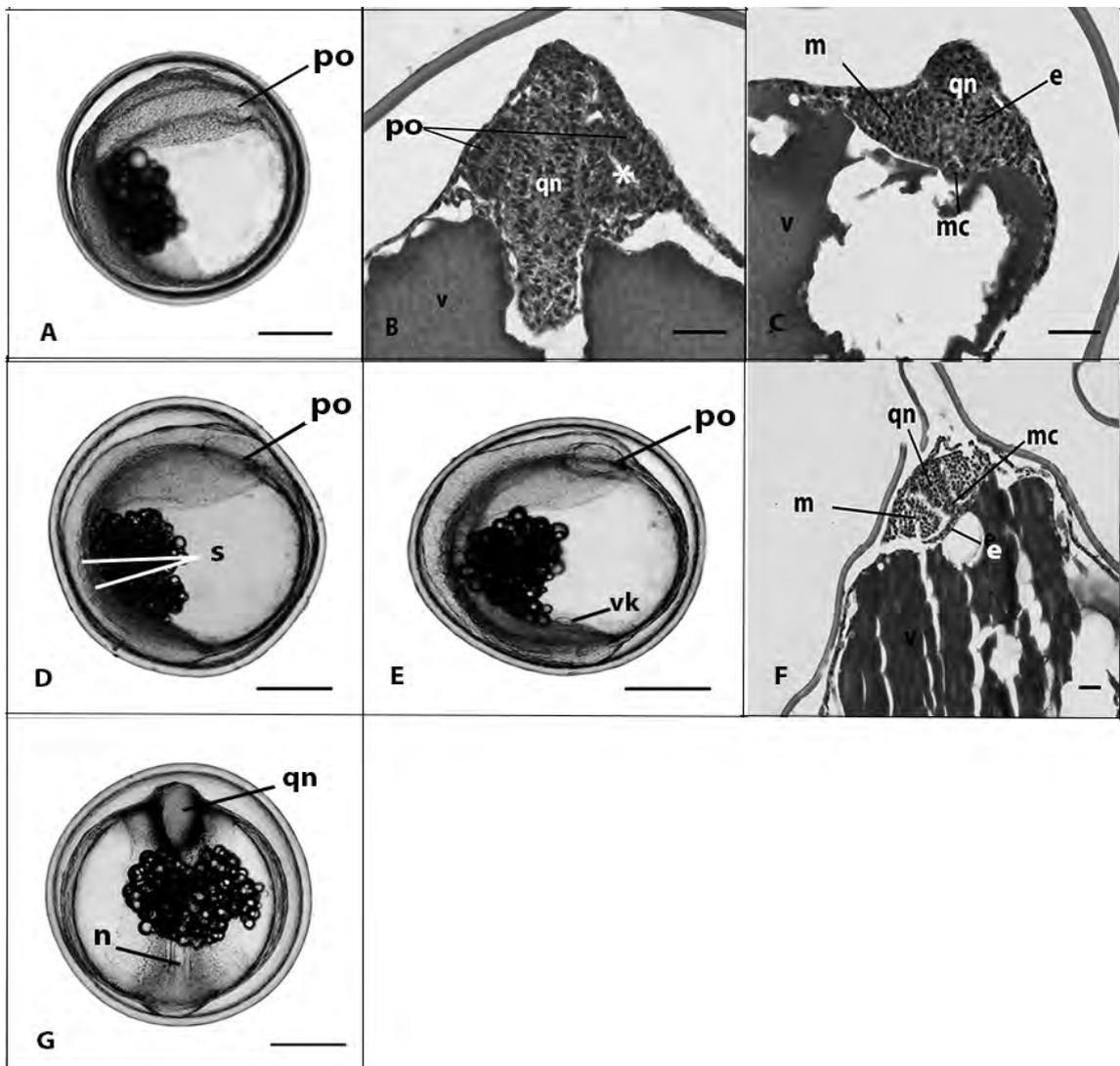
### 7.1.2. Fase de organogénesis

#### 7.1.2.1. Paso E5. Somitogénesis.

Éste paso dio inició con el inicio de la formación de los lóbulos ópticos (14 h, 57 min) y finalizó con la aparición de los esbozos de las plácodas óticas (23 h, 1 min). El

## Resultados

primer estadio es el estadio primordios ópticos (14 h, 57 min), en éste aún no se distinguen los neurómeros. Se observó la presencia de los primordios ópticos en posiciones laterales a la quilla neural presentaron un lumen ventricular (fig. 5.1B). En la región más posterior, lateralmente a la quilla neural, se observa el mesodermo, y debajo de la quilla el mesodermo cordal (fig. 5.1C). En el siguiente estadio, el estadio 2 somitas (15 h, 50 min), se observó la formación de las somitas con la presencia de dos de ellas y los primordios ópticos son más notables (fig. 5.1D). En el estadio 5 somitas (16 h, 52 min) se observó la presencia de la vesícula de Kupffer y el esbozo del notocordio es más notable (fig. 5.1E, F); se observaron las células del endodermo por debajo del mesodermo cordal para así dar origen al intestino (fig. 5F).

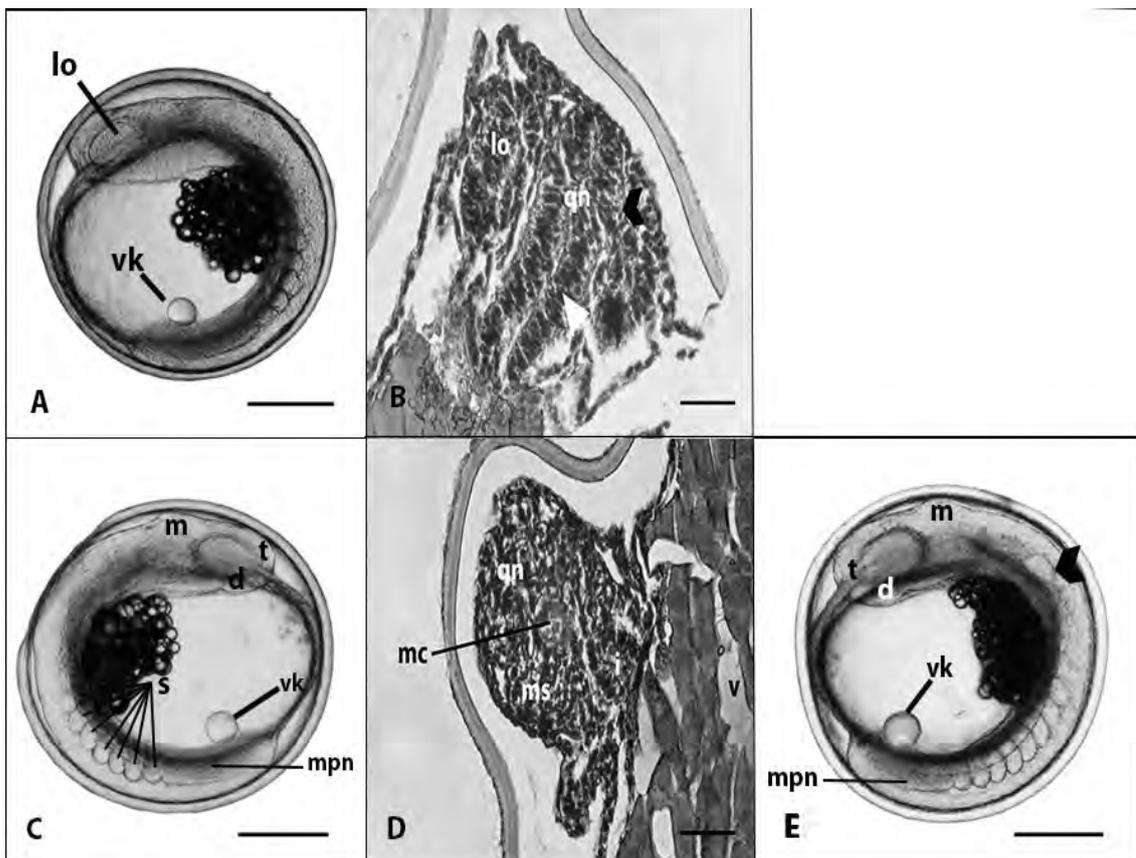


**Figura 5.1.** Estadios representativos del paso E5, somitogénesis. **A)** embrión en estadio primordios ópticos, **B)** corte transversal, observe los lóbulos ópticos lateralmente a la quilla neural y un lumen presente en ellos (\*), y **C)** corte transversal en región posterior. **D)** Embrión en estadio 2 somitas. **E)** Embrión estadio 5 somitas, **F)** corte transversal y **G)** en vista ventral.

## Resultados

Escalas: A), C), D), E) = 200  $\mu\text{m}$ ; c) = 60  $\mu\text{m}$  y g) 50  $\mu\text{m}$ . m = mesodermo, mc = mesodermo cordal, n = esbozos del notocordio, po = primordios ópticos, qn = quilla neural, vk = vesícula de Kupffer, v = vitelo.

En el estadio 6 somitas (18 h, 57 min), en la quilla neural, en posición media ventral-dorsal, las células iniciaron un movimiento lateral alejándose de la parte media de la quilla neural, estos movimientos darán origen al neurocele (lumen) del tubo neural y se observa un tallo óptico el cual mantenía en unión a los lóbulos ópticos con la quilla neural (fig. 5.2B). En el estadio 7-8 somitas (21 h) se observaron pronunciados engrosamientos en la parte más rostral del embrión lo que permitió la diferenciación de tres regiones cefálicas (neurómeros): telencéfalo, diencefalo y mesencéfalo (fig. 5.2C). El mesodermo cordal se encuentra más definido, lateralmente se encuentra el mesodermo somítico y debajo del cordal se observa el intestino aún sin lumen (5.2D). En el estadio 9 somitas (23 h, 1 min), en la parte media entre los lóbulos ópticos y la primera somita se encuentran los esbozos de las plácotas óticas. La vesícula de Kupffer presentó su mayor tamaño y los límites entre los neurómeros se hacen más claros (fig. 5.2E).



**Figura 5.2.** Estadios representativos del paso E5, somitogénesis. A) estadio 6 somitas y B) corte transversal, observe el tallo neural, entre el lóbulo óptico y la quilla neural (➤) y la

## Resultados

reorganización pseudoestratificada que dará origen al lumen (▲). **C)** estadio 7-8 somitas y **D)** corte transversal. **E)** Embrión en estadio 9 somitas, se señala la plácoda ótica (▲). Escalas: A), C) y E) = 200 µm; B) y D) = 60 µm. d = diencéfalo, i = intestino, lo = lóbulos ópticos, m = mesencéfalo, mc = mesodermo cordal, mpn = mesodermo presomítico no segmentado, ms = mesodermo somítico, n = notocordio, qn = quilla neural.

### 7.1.2.2. Paso E6. Sincronización neuromuscular.

Este paso dio inicio con la operación del sistema muscular del embrión (25 h), y su fin fue marcado por los primeros latidos del corazón (32 h, 26 min). En el primer estadio, el estadio 13 somitas (25 h), la quilla neural se transforma en tubo neural (ya presenta neurocele:lumen), los lóbulos ópticos se transformaron en copas ópticas, en ellas se diferenció el neuroepitelio retinal pseudoestratificado, el epitelio pigmentario, la plácoda de cristalino, que se encontraba en separación del integumento, y debajo de la plácoda, la cavidad de la fisura de coroides (fig. 6.1B). Simultáneamente la vesícula de Kupffer es absorbida por completo, el notocordio presentó vacualización lo cuál le permitió contar con rigidez (fig. 6.1C), los bloques de somitas laterales (mioblastos) tomaron forma de “V” lo que indicó la transformación de los somitas en miómeros y su futura transformación en las fibras musculares dorsal (epiaxial) y ventral (hipoaxial). Este cambio, junto con la rigidez del notocordio, brindaron la capacidad al embrión para que éste desarrollara sus primeros movimientos. Las primeras contracciones musculares están correlacionadas con el crecimiento de axones en el desarrollo motoneural primario (desarrolladas en el cerebro y la espina cordal) dado que el inicio de la operación del sistema muscular se sincroniza con el inicio de la operación del sistema nervioso.

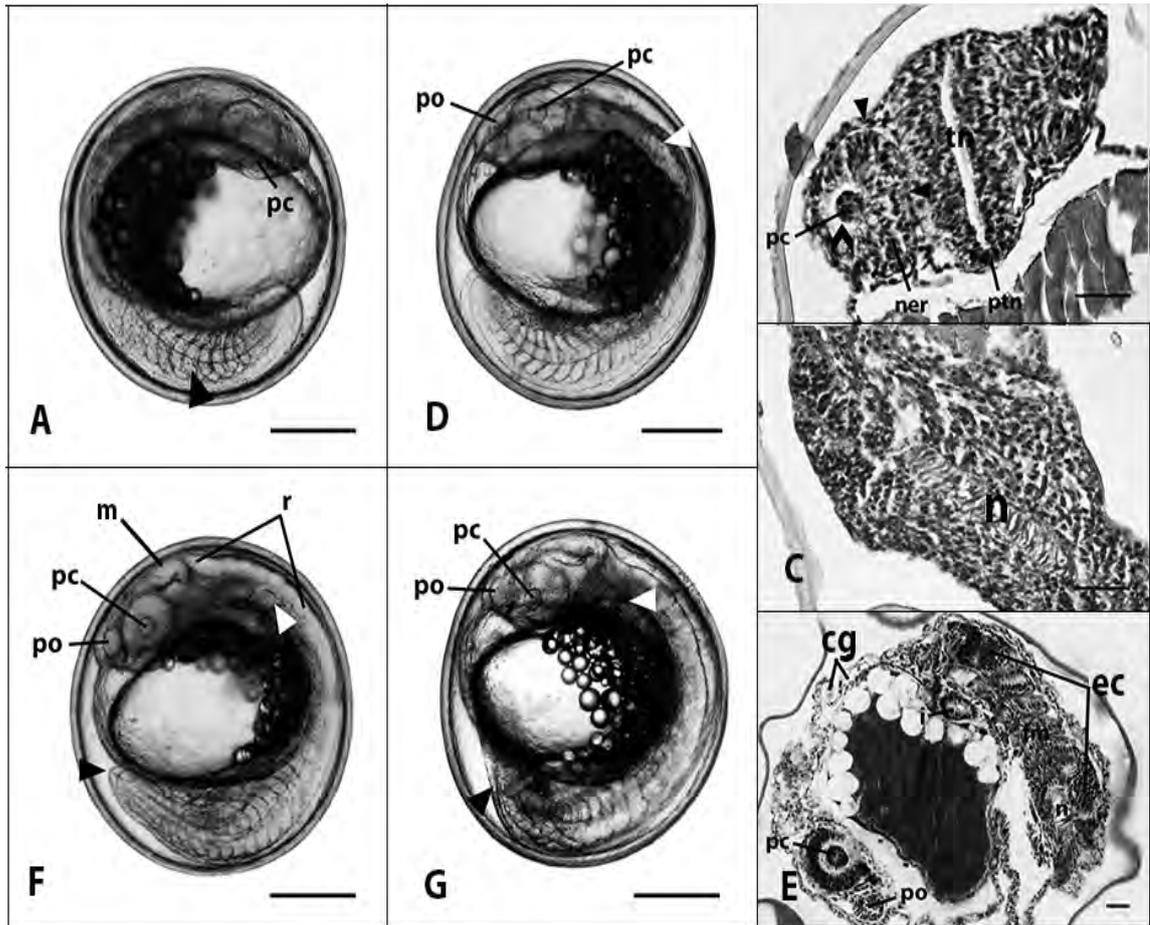
En el estadio 14 somitas (27 h), las plácodas óticas se transformaron en vesículas óticas, esto señalado por la presencia de dos otolitos en ellas. Estas presentaron forma ovoide. Delante de las copas ópticas se observa la plácoda olfativa (fig. 6.1D). El notocordio presenta vacuolas más grandes y el integumento presenta un grosor de dos células, conformadas por células planas mezcladas con células globosas (6.1E).

En el estadio 16 somitas (28 h, 5 min) detrás del mesencéfalo forma una cuarta cavidad cefálica: el romboncéfalo, compuestos por el cerebelo y los rombómeros los cuáles presentaban límites claramente definidos. Las vesículas presentaron una cavitación dentro de ellas, de forma ovoide, y dentro de estas cavitaciones se encontraron los otolitos. La plácoda olfativa y la ótica presentaron forma ovoide, la primera cambiando su forma en comparación al estadio anterior y la

## Resultados

segunda manteniendo dicha forma. Se inició la formación del pliegue de aleta caudal (fig. 6.1F).

En el estadio giro caudal (32 h, 3 min) el crecimiento de la porción caudal del embrión produjo una elongación del tallo en una posición curva ventralmente que provocó que esta (porción caudal) se flexionara hacia un costado del vitelo y despegada del mismo. La vesícula ótica tomó una posición más anterior-posterior en el embrión y los otolitos aumentaron su tamaño (fig. 6.1G).



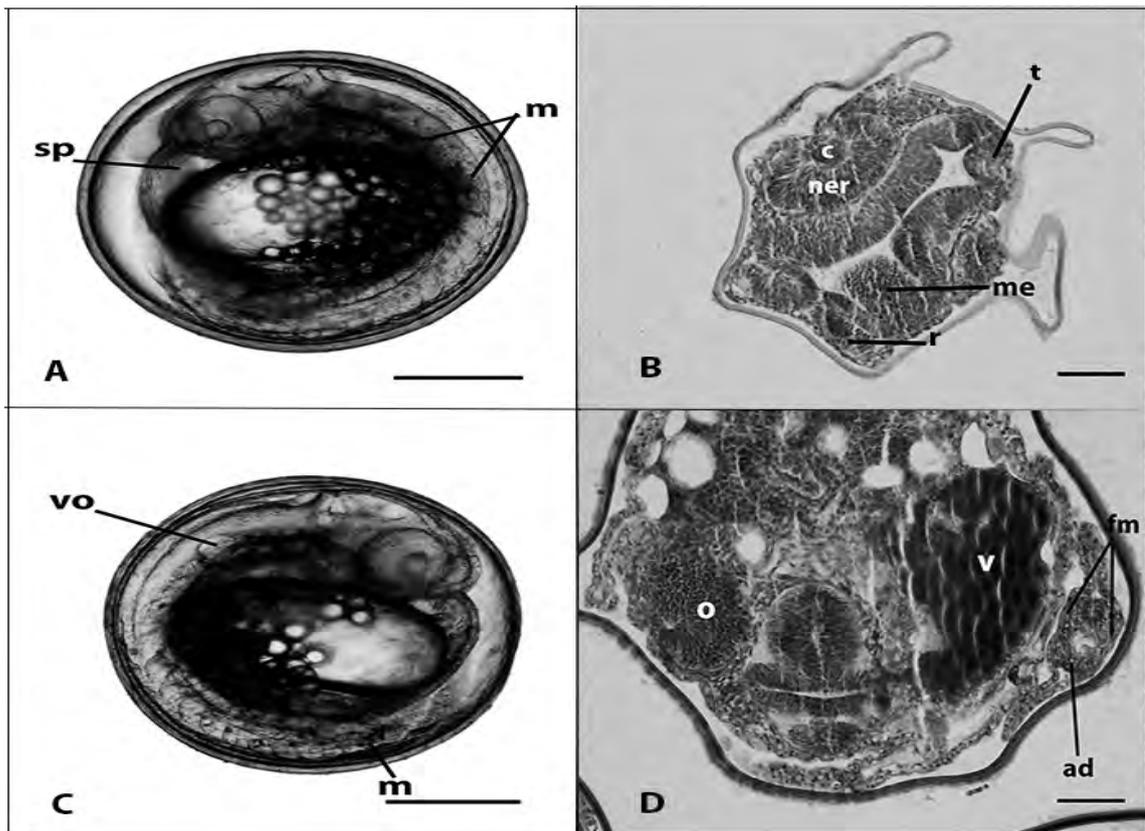
**Figura 6.1.** Estadios representativos del paso E6, *Sincronización neuromuscular*. **A)** Embrión en estadio 13 somitas, se señalan los miómeros (▲), **B)** en corte transversal, se señala la fisura coroidea (▲) y el epitelio pigmentario (▲), y **C)** en corte sagital. **D)** Embrión en estadio 14 somitas, se señala la vesícula ótica (▲), y **E)** en corte sagital. **F)** Embrión en estadio 16 somitas, se observa la vesícula ótica con una cavidad (▲) y el esbozo del pliegue de la aleta embrionaria (▲). **G)** Embrión en estadio torsión caudal, se señala el sitio de torsión caudal (▲) y las vesículas óticas. Escalas: A), D), F) y G) = 200  $\mu\text{m}$ ; B) y C) = 60  $\mu\text{m}$ , E) = 50  $\mu\text{m}$ . cg = células globosas, ec = espina cordal, fm= fibras musculares, i = intestino, m = mesencéfalo, n = notocordio, nrp = neuroepitelio retinal pseudoestratificado, pc = plácoda de cristalino, po = plácoda olfativa, ptn= piso del tubo neural, tn = tubo neural.

## Resultados

### 7.1.2.3. Paso E7. Inicio del funcionamiento del corazón

El inicio del funcionamiento del corazón (35 h, 46 min) marcó el inicio de este paso y llegó a su fin con la eclosión de los embriones (52 h, 21 min). En el primer estadio, primeros cromatóforos (35 h, 46 min) se observaron melanóforos en posición de la línea ventral media de la región troncal, justo detrás del nivel de las vesículas óticas. El corazón se hizo funcional y sus primeros latidos fueron arrítmicos,  $54 \pm 15$  latidos por minuto. El embrión, en su posición anterior, se despegó del vitelo y el espacio entre ellos aumentó (seno perivitelino) (fig. 7.1A). A nivel histológico se observaron los límites entre las regiones cefálicas (neurómeros) (fig. 7.1B)

En el estadio cromatóforos contraídos (40 h, 56 min), los melanóforos presentaron forma de puntos (contraídos). Aumentaron en número y distribución (fig. 7.1C). En este estadio se observa color rojo desde la parte posterior de la cabeza y a lo largo del tronco, esto por la presencia de eritróforos. A nivel histológico se distingue la aorta dorsal debajo del notocordio (fig. 7.1D).



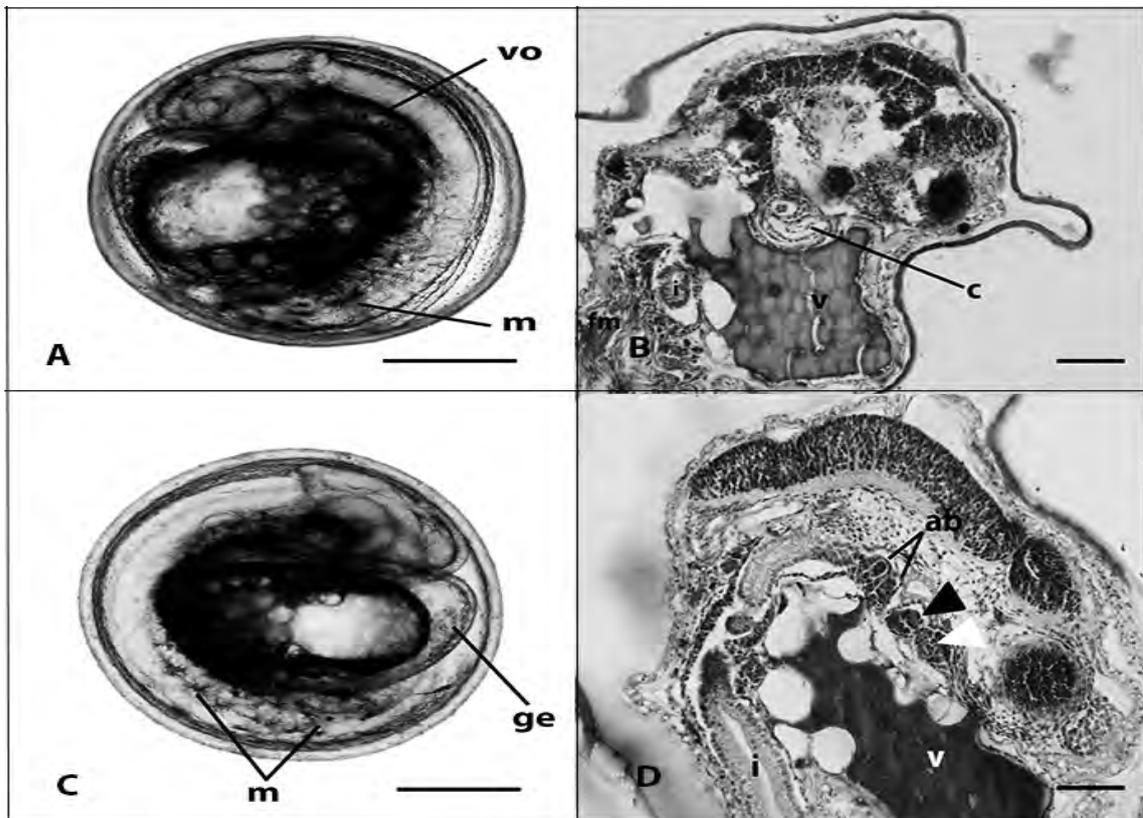
**Figura 7.1.** Estadios representativos del paso E7, *Inicio del funcionamiento del corazón*. **A)** Embrión en estadio de primeros cromatóforos, y **B)** corte sagital. **C)** Embrión en estadio melanóforos contraídos, y **D)** corte transversal. Escalas: A) y C) = 200  $\mu\text{m}$ ; B) y D) = 50  $\mu\text{m}$ . a = aorta dorsal, dp = esbozos de los conductos pronéfricos, fm = fibras musculares, m =

## Resultados

melanóforos, me = mesencéfalo, nrp = neuroepitelio retinal pseudoestratificado, o = ojo, pc = plácoda de cristalino, r = rombocéfalo, t = telencéfalo, v = vitelo, vo = vesícula ótica.

En el estadio cromatóforos expandidos (44 h, 18 min) los melanóforos aumentan su cobertura y su forma cambia, presentando ahora forma dendrítica (fig. 7.2A). En un par de embriones descorionizados se observa que los melanóforos y eritróforos se distribuyeron dorso ventralmente y en la línea ventral media de la región troncal. Se observa el corazón como un tubo con paredes delgadas (fig. 7.2B).

En el último estadio de este paso, el estadio pre-eclosión (48 h, 8 min), la forma dendrítica de los melanóforos aumento en longitud y junto con los eritróforos mantienen su misma distribución del estadio anterior, mientras que el resto de la piel se mantiene transparente. Los ojos aún no presentan pigmentación. En la parte ventral del vitelo se observaron las glándulas de eclosión (fig. 7.2C). El intestino presenta un lumen rodeado por epitelio simple columnar y en la zona faringal se observaron los esbozos de los arcos branquiales, los dos primeros arcos darán origen al mandibular y el arco hioideo (fig. 7.2D).



**Figura 7.2.** Estadios representativos del paso E7, *Inicio del funcionamiento del corazón*. **A)** Embrión en estadio de cromatóforos expandidos, y **B)** corte transversal. **C)** Embrión en estadio

## Resultados

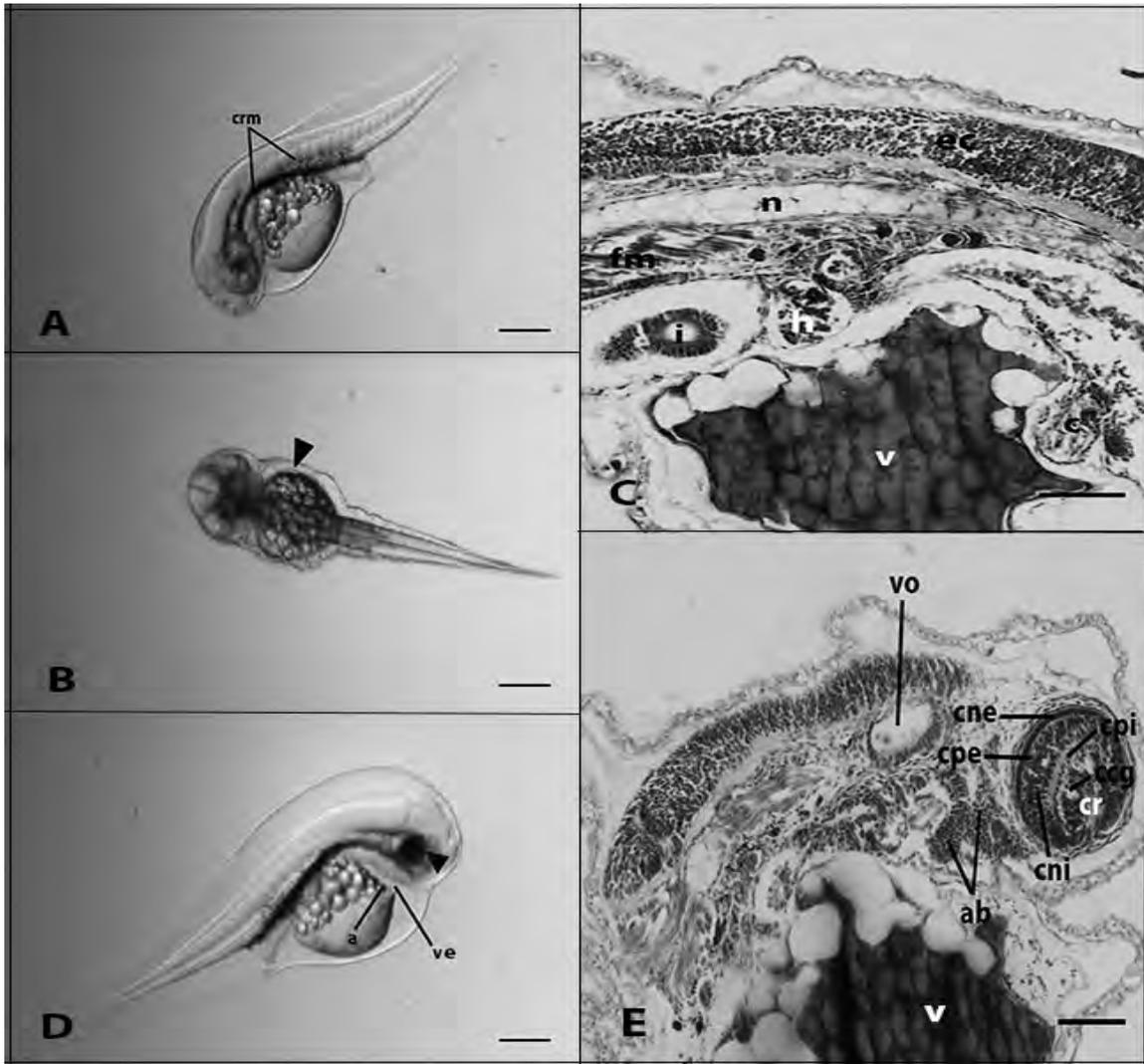
pre-eclosión, y **D)** corte transversal, se observan los arcos branquiales, los más anteriores son los que originan la mandíbula (**A**) y el arco hioideo (**▲**). Escalas: A) y C) = 200  $\mu\text{m}$ ; B) y D) = 50  $\mu\text{m}$ . ab = arcos branquiales fm = fibras musculares, i = intestino, m = melanóforos, v = vitelo.

### 7.1.1. Fase eleuteroembrión

#### 7.1.1.1. Paso E8, Eclosión

El primero estadio, brote de la aleta pectoral (52 h, 21 min), marcó el inicio del paso, y llegó a su fin cuando los ojos están completamente pigmentados (77 h, 42 min). En el primer estadio los embriones eclosionaron y se convirtieron en eleuteroembriones. En este estadio la longitud notocordal fue  $1416 \pm 41 \mu\text{m}$ . Los latidos del corazón aumentaron a un rango de  $135 \pm 15$  latidos por minuto. Al eclosionar las glándulas de eclosión desaparecieron, los eleuteroembriones fueron capaces de nadar y presentaron el mesénquima de la aleta pectoral. La distribución de los cromatóforos fue mayor pues su distribución abarcó a partir de la parte trasera de los ojos (estadios anteriores se observaban detrás de las vesículas óticas), la presencia de los melanóforos fue mayor que la de los eritróforos (fig. 8.1A y B) y presentaron forma extendida (dendrítica). Los ojos aún no presentaban pigmentación. A nivel histológico se observó la formación del hígado por delante del intestino (fig. 8.1C).

En el estadio, inicio de la pigmentación de los ojos (58 h, 59 min), se observaron 5 de las 6 capas oculares: capa plexiforme externa, capa plexiforme interna, capa de células ganglionares, capa nuclear externa y capa nuclear interna. El mesénquima de la aleta pectoral aumenta de tamaño y se observa el corazón dividido en dos cavidades, ventrículo y atrio (fig. 8.1D).

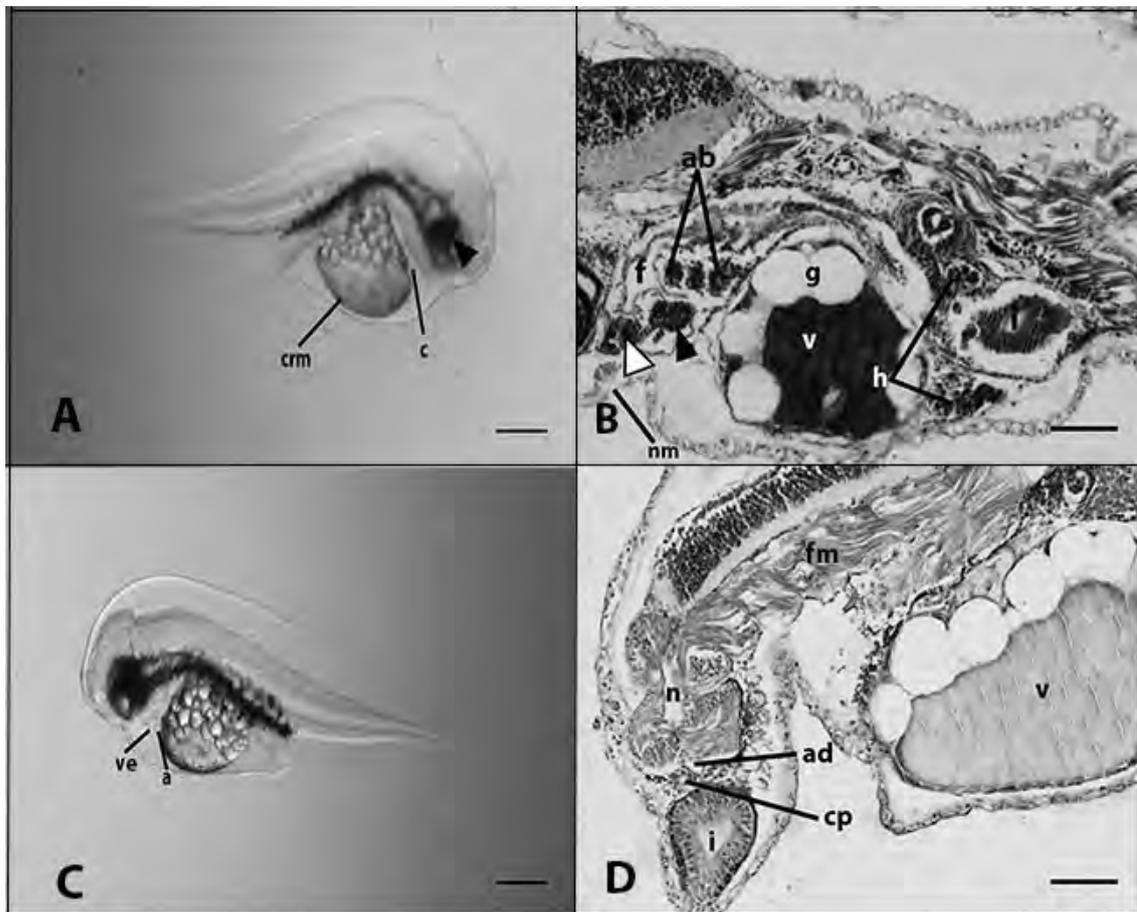


**Figura 8.1.** Estadios representativos del paso E8, *Eclosión*. **A)** Embrión en estadio esbozo de la aleta pectoral, **B)** en vista dorsal, obsérvese el mesénquima de la aleta (▲) y **C)** corte transversal. **D)** Embrión en estadio inicio de la pigmentación del ojo, y **E)** corte sagital. Escalas: A), B) y D) = 300  $\mu\text{m}$ ; C) y E) = 50  $\mu\text{m}$ . a = atrio, ab = arcos branquiales, c = corazón, ccg = capa ganglionar, cni = capa nuclear interna, cpe = capa plexiforme externa, cpi = capa plexiforme interna cr = cristalino, crm = cromatóforos, n = notocordio, fm = fibras musculares, h = hígado, i = intestino, v = vitelo, ve = ventrículo, vo = vesícula ótica.

En el estadio estrechamiento del saco vesicular dermal (65 h, 32 min) la frecuencia cardiaca de los embriones fue de  $120 \pm 20$  latidos por minuto. Se observan melanóforos en la parte del dorsal del vitelo además de una pigmentación de color amarillo en la parte media ventral lo que indica la presencia de xantóforos (fig. 8.2A). La pigmentación del ojo aumenta. A nivel histológico se observaron 4 arcos branquiales, el arco que da origen al arco hioides y al mandibular, el hígado aumentó su tamaño (fig. 8.2B).

## Resultados

El estadio estrechamiento del seno dorsal (70 h, 29 min), el seno perivitelino aumentó, los ojos presentaron mayor pigmentación y existió mayor presencia de xantóforos en los patrones de pigmentación (8.2A). Se observaron neuromastos distribuidos en la parte frontal de la cabeza y a lo largo del tronco los que les permitieron a los eleuteroembriones aumentar su capacidad de sensibilidad y respuesta ante los movimientos ocurridos en el agua. Los ojos presentaron 5 de las 6 distintas capas celulares. Se observaron los conductos pronéfricos y debajo del intestino la aorta dorsal (fig. 8.3D). Los eleuteroembriones aumentaron su capacidad de sensibilidad y respuesta ante los movimientos ocurridos en el agua.



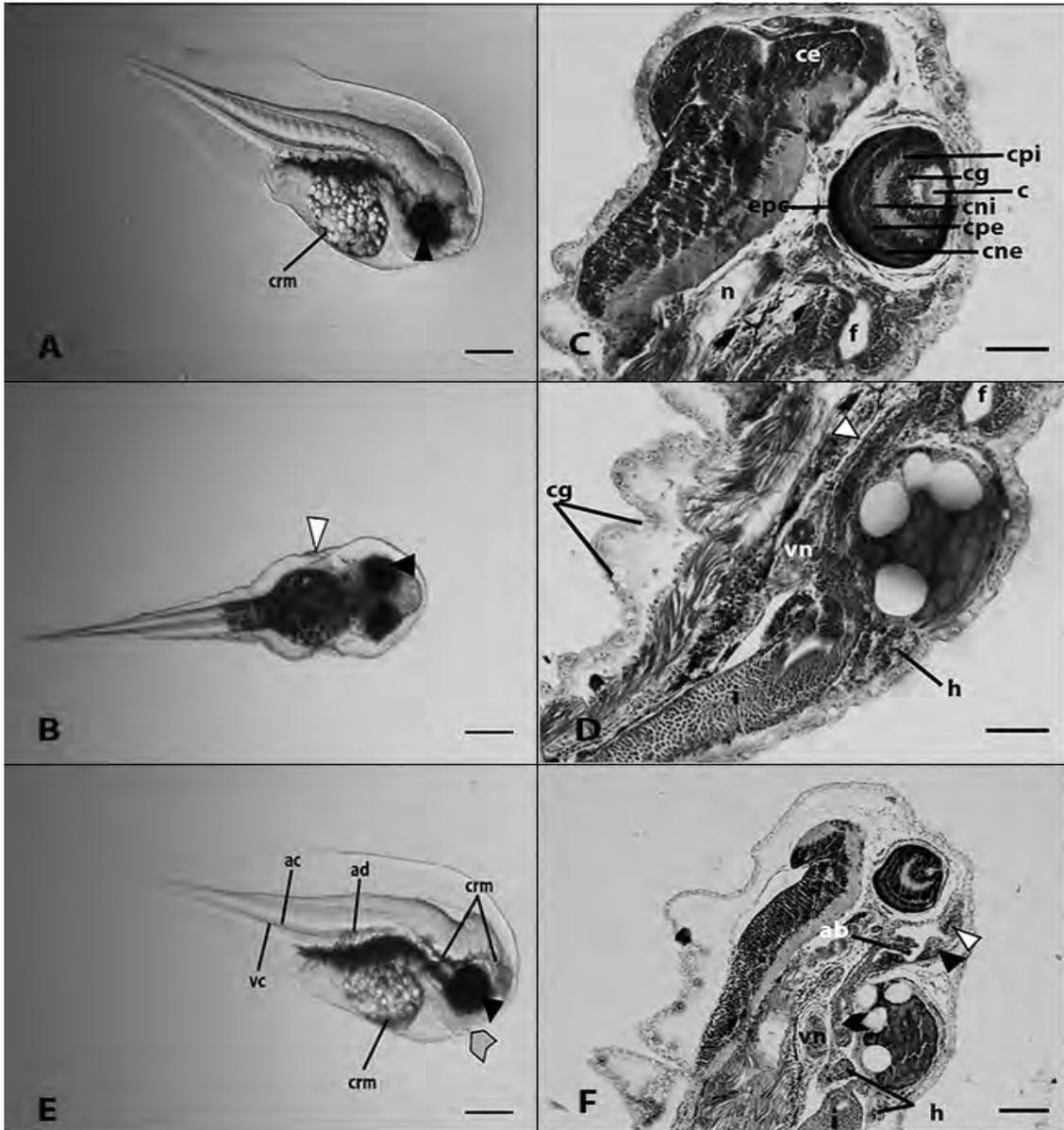
**Figura 8.2.** Estadios representativos del paso E8, *Eclosión*. **A)** Embrión en estadio inicio de la pigmentación del ojo, se señalan los ojos pigmentados (▲), **B)** corte sagital, se señalan el arco hioideo (▲) y el mandibular (△). **C)** Embrión en estadio estrechamiento dorsal, y **E)** corte sagital. Escalas: A) y C) = 300 µm; B) y D) = 50 µm. a = atrio, ab = arcos branquiales, a = atrio, ab = arcos branquiales, ad = aorta dorsal, cp = conductos pronéfricos, n = notocordio, nm = neuromasto, f = faringe, fm = fibras musculares, g = glóbulo de aceite, h = hígado, i = intestino v = vitelo, ve = ventrículo.

### 7.1.3.2. Paso E9. Inicio de la circulación sanguínea

El inicio de la circulación sanguínea indicó el inicio de este paso (77 h, 43 min) y finalizó con la primera alimentación exógena (etapa de alimentación mixta) (102 h, 1 min). Este paso se caracterizó por la sincronía en el desarrollo de los sistemas esqueléticos, excretor, visual, digestivo y mecano-sensorial lo que le permitió a los embriones contar con conducta alimenticia (percepción de la presa, captura, ingesta y digestión, absorción asimilación y excreción) para dar inicio al periodo larval. La longitud notocordal de los embriones fue de  $1741 \pm 71 \mu\text{m}$ . El rango de latidos del corazón aumentó a  $225 \pm 43$  latidos por minuto.

En el primer estadio, ojos pigmentados (77 h, 43 min), los ojos presentaron las 6 capas oculares (de la más interna a la más externa desde el cristalino): capa ganglionar, capa plexiforme interna, capa nuclear interna, capa plexiforme externa, capa nuclear externa y el epitelio pigmentario (fig. 9.1B). El esófago se presenta alineado por un epitelio simple cúbico y se observa en posición superior al intestino, la vejiga natatoria en formación (fig. 9.1C). La pigmentación de los cromatóforos que se encuentran en la parte dorsal del vitelo se hace más notable. Las aletas pectorales aumentan su longitud en posición anterior posterior (fig. 9.1A).

En el estadio apertura oral (83 h, 37 min), ocurrió la apertura de la boca y el ano se mantuvo cerrado. Se observa presencia de cromatóforos en la parte frontal de la cabeza y por arriba del ojo, aumentado el patrón de pigmentación. La circulación sanguínea a través de la aorta dorsal y la arteria caudal (parte posterior de la aorta), debajo de ésta estuvo continua la vena caudal (fig. 9.1D). Se observa en la región oromandibular los esbozos del cartílago de Meckel en la región del arco mandibular y junto a este, posteriormente, el arco hioideo. (fig. 9.1F).

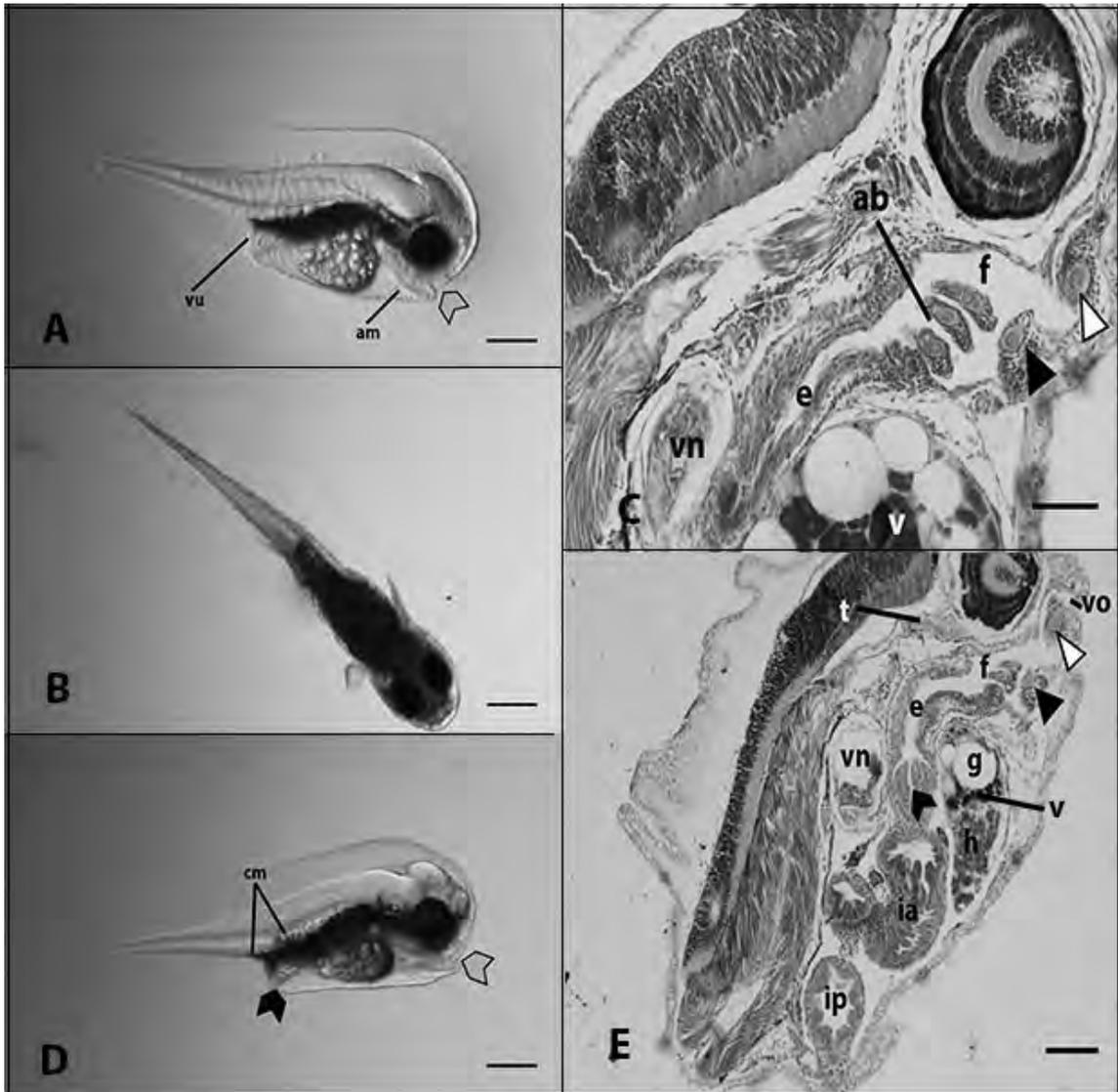


**Figura 9.1.** Estadios representativos del paso E9, *Inicio de la circulación sanguínea*. **A)** Embrión en estadio ojos pigmentados, **B)** en vista dorsal, obsérvese el mesénquima de la aleta ( $\blacktriangle$ ) y los ojos pigmentados completamente ( $\blacktriangle$ ), **C)** corte parasagital, y **D)** corte sagital, se señala el esófago ( $\blacktriangle$ ). **E)** Embrión en estadio apertura de la boca, se señala la boca ya abierta ( $\blacktriangle$ ), los ojos pigmentados ( $\blacktriangle$ ) y **F)** corte sagital, se señalan el arco hioideo ( $\blacktriangle$ ) y el mandibular ( $\blacktriangle$ ). Escalas: A), B) y D) = 300  $\mu$ m; C) y D) = 80  $\mu$ m; F) 50  $\mu$ m. ab = arcos branquiales, ad = aorta dorsal, c = cristalino, cg = células globosas, ccg = capa ganglionar, cne = capa nuclear externa, cni = capa nuclear interna, cpe = capa plexiforme externa, cpi = capa plexiforme interna, crm = cromatóforos, ep = epitelio pigmentario, n = notocordio, f = faringe, fm = fibras musculares, h = hígado, i = intestino, v = vitelo, vc = vena caudal, ve = ventrículo, vn = vejiga natatoria.

## Resultados

En el estadio aletas pectorales libres (91 h, 21 min) las aletas sobrepasaron los límites de la capa que rodeaba al embrión, estas fueron notables en vista dorsal. Se observa la vejiga urinaria (fig. 9.2A y B). La vejiga natatoria presenta mayor desarrollo. Los arcos branquiales presentan cartílagos. Se observa el esófago continuo a la faringe y alineada por un epitelio simple escamoso. (fig. 9.2C).

En el estadio apertura del ano (102 h, 1 min), la distribución de los cromatóforos es mayor en el tronco del embrión pues se observaron los primeros melanóforos sobrepasando el nivel del ano (sólo ventralmente) y aumentaron su longitud y distribución en posición media-dorsal (fig. 9.2D). La frecuencia cardiaca que presentaron los embriones fue de  $170 \pm 20$  latidos por minuto. El esófago presentó un epitelio estratificado escamoso al igual que en el estadio y en la expansión de éste, se observa un ensanchamiento que resultó ser el intestino. El intestino presentó microvellosidades y se dividió en dos partes, el intestino anterior y el posterior, no se observaron células globosas. El hígado aumentó su tamaño. La vejiga natatoria se presentó inflada lo que indica una vejiga natatoria funcional. En la región oromandibular se observaron en formación la trabécula, el arco hioideo y en el arco mandibular el cartílago de Meckel. Al final de este paso el vitelo no es absorbido completamente quedando una pequeña cantidad. (fig. 9.2E).



**Figura 9.2.** Estadios representativos del paso E9, *Inicio de la circulación sanguínea.* **A)** Embrión en estadio aletas pectorales libres, se señala la boca abierta (▲), **B)** en vista dorsal, y **C)** corte parasagital, se señalan el arco hioideo (▲) y el mandibular (△). **D)** Embrión en estadio apertura del ano, se señala el ano abierto (▲) y la boca (▲), y **E)** corte sagital, posteriormente al esófago el intestino (▲), se señalan el arco hioideo (▲) y el mandibular (△). Escalas: A), B) y D) = 300  $\mu\text{m}$ ; C) = 80  $\mu\text{m}$ ; E) 50  $\mu\text{m}$ . a = atrio, ab = arcos branquiales, am = arco mandibular, cm = cromatóforos, e = esófago, f = faringe, g=glóbulos de aceite, h = hígado, ia = intestino anterior, ip = intestino posterior, t = trabécula, v = vitelo, ve = ventrículo, vn = vejiga natatoria, vo = válvula oral, vu = vejiga urinaria.

## 8. DISCUSIÓN

El presente trabajo dividió el periodo embrión en 9 pasos y 41 estadios, estos designados de acuerdo a las características morfo-funcionales de los organismos. El desarrollo de *S. annulatus* presentó un patrón similar a los de otros tetraodontidos, sin embargo, existieron diferencias en el tiempo de aparición y la velocidad del desarrollo de algunas estructuras. El desarrollo embrionario de *S. annulatus* a 26°C es 4 más corto que el de otros tetraodontidos estudiados a temperaturas similares. De acuerdo con la teoría de la ontogenia en saltos, la densidad y el volumen del vitelo (contenido energético) pueden ser variables que ayuden a explicar las diferencias que existen en las historias de vida temprana entre especies. Para tetraodontidos esta información no se encuentra disponible. Sin embargo, debido a que en esta familia los huevos bentónicos presentan las mismas características morfológicas (esferoidales, adherentes, con múltiples glóbulos de aceite, vitelo no segmentado; Leis, 1984; Watson, 1996), su tamaño puede ser usado como una aproximación del contenido energético. Los huevos de *S. annulatus* son 22% más pequeños que los de su congénere *Sphoeroides maculatus* (Welsh y Breder, 1922) y comparado con los de otros géneros de la misma familia, son similares a los de *Cantighaster rivulata* (Arai & Fujita, 1988), más grande que los de *Tetraodon* (Zaucker *et al.*, 2014) y más pequeños que los de *Takifugu* (Fujita y Shinahora, 1986; Fujita y Honna, 1991; Chen, 2004).

En *S. annulatus* el paso activación (E1) es caracterizado por la combinación citoplasmática y reorganización de dos células fisiológicamente distintas (gametos) en una sola célula (cigoto). Los procesos que ocurren durante este paso (por ejemplo, reacción cortical, diferenciación bipolar, formación del espacio perivitelino) establecen las condiciones estructurales desde las cuales el desarrollo parte. Este paso es equivalente al periodo cigoto (Kimmel *et al.*, 1995) descrito para *T. nigroviridis* (Zucker *et al.*, 2014), *Takifugu obscurus* (Jang *et al.*, 1996), *T. rubripes* (Uji *et al.*, 2011) y *T. niphobles* (Gallego *et al.*, 2017). La transición entre el paso E1 y el E2 (segmentación) es el inicio de la división mitótica sincrónica del blastodisco, dando origen a blastómeros sin una aparente cito-diferenciación. En *S. annulatus* la segmentación es meroblástica, patrón único de los teleósteos (Collazo *et al.*, 1994). En muchos teleósteos, como *Centropristis striata* (Wilson, 1889; referido el autor como *Serranus atrarius*), *Fundulus heteroclitus* (Lentz y Trinkaus, 1967), *Fundulus xenicus* (= *Adinia xenica*; Cunningham y Balon, 1985) y *D. rerio* (Kimmel y Law, 1985), las conexiones citoplasmáticas entre blastómeros no marginales están descritas durante los primeros seis ciclos celulares. En *S. annulatus*, no hubo evidencia histológica o morfológica de estas conexiones citoplasmáticas ente blastómeros no marginales. Para confirmar

## Discusión

dichas conexiones citoplasmáticas en estas especies, es necesario emplear técnicas más sensitivas a las usadas en este trabajo (por ejemplo, tinciones fluorescentes, microscopía confocal o microscopía electrónica de transmisión). En *S. annulatus*, las primeras cinco divisiones del blastodisco (2 a 32 células) ocurrieron como en *T. nigroviridis* (Zaucker *et al.*, 2014) y *Oryzias latipes* (Iwamatsu, 2004); sin embargo, a partir de la sexta división, la organización de los blastómeros en el centro del blastodisco, particularmente el número de niveles difiere marcadamente con estas especies. La asincronía en la segmentación a partir del estadio 128 células y la formación de las tres capas celulares (células envoltantes, células profundas y capa sincitial vitelina) dieron inicio al paso Estereoblástula (E3). La capa sincitial vitelina, estructura única de los patrones meroblásticos de los teleósteos (Collazo *et al.*, 1994), tiene funciones críticas en el desarrollo de los embriones, como la de la digestión y transporte de los nutrientes del vitelo (Kunz, 2004), el establecimiento de la simetría en los embriones y su implicación en la morfogénesis (Carvalo y Heinsenber, 2010). Durante este paso, las células profundas muestran notables cambios morfológicos, como la presencia de extensiones citoplasmáticas (filopodios) que se relacionan con la adquisición de movimientos (Trinkaus, 1993). Los movimientos de estas células le otorgan al blastodermo una forma bicóncava. En *S. annulatus*, este cambio en la forma del blastodermo ocurre anterior al inicio de la epibolia que también es observado en *T. rubripes* (Uji *et al.*, 2011) y otras especies como *O. latipes* (Iwamatsu, 2004) y *Gadus morhua* (Hall *et al.*, 2004); sin embargo, esto no ha sido reportado en el desarrollo de *T. nigroviridis* (Zaucker *et al.*, 2014) y *T. niphobles* (Gallego *et al.*, 2017), ni en *D. rerio* (Kimmel *et al.*, 1995). La reorganización y cambios en la morfología celular de las células profundas indican movimientos de intercalación que inician con la epibolia. Posterior a dicho evento, las células profundas sufren movimientos morfogénicos que llevan a la transición del paso E3 al E4 (gastrulación). La gastrulación es el proceso morfogénico que produce la organización celular de las capas germinales. Después de la intercalación celular durante el adelgazamiento del blastodermo, la involución, como segundo movimiento morfogénico, forma el hipoblasto, que se evidencia por la formación de anillo germinal. En *S. annulatus*, el anillo germinal empieza a formarse del 20 al 30% de epibolia, pero se hizo patente en el estadio de epibolia al 40%, siendo similar a lo reportado para *T. ocellatus* (Chen, 2004), *T. rubripes* (Uji *et al.*, 2011) y *T. nigroviridis* (Zaucker *et al.*, 2014) y *O. latipes* (Iwamatsu, 2004). Sin embargo, esto contrasta con lo reportado para *T. niphobles* (Gallego *et al.*, 2017) y *D. rerio* (Kimmel *et al.*, 1995), pues en estas especies el anillo germinal aparece al 50% o más de epibolia. La heterocronía entre la epibolia y la gastrulación

## Discusión

que se observó soportan la noción de la independencia entre estos dos procesos, lo cual fue demostrado en *F. heteroclitus* (Trinkaus, 1984). En este sentido, es claro que, aunque se utiliza el porcentaje de epibolia para nombrar estadios, estos estadios no son equivalentes entre especies; así que, para establecer patrones morfogénéticos es necesario tener un enfoque especie-específico. Por ejemplo, en *S. annulatus*, el cierre del blastoporo es concurrente con la formación de la quilla neural como en otros tetradontidos (Uji, *et al.*, 2011; Zaucker *et al.*, 2014); mientras que en *G. morhua* al cierre del blastoporo se presentan 10 somitas, la vesícula de Kupffer y los lóbulos ópticos (Hall *et al.*, 2004).

El inicio de la formación de las somitas y el sistema nervioso central fue el umbral que dio inicio al paso de somitogénesis (E5). Además de las somitas, otras estructuras transitorias estuvieron implicadas en la diferenciación de los órganos, tal como la vesícula de Kupffer y el notocordio, las cuales aparecieron en este paso. Los primordios ópticos en *S. annulatus* aparecieron antes de la formación de las somitas; este proceso ocurre de manera similar en *T. nigroviridis* (Zaucker *et al.*, 2014), mientras que en *T. obscurus*, *T. ocellatus*, *T. rubripes* y *T. niphobles* (Jang *et al.*, 1996; Chen, 2005; Uji *et al.*, 2011; Gallego *et al.*, 2017) se desarrollan a partir de la formación de los primeros tres somitas. En *S. annulatus*, la vesícula de Kupffer aparece en el estadio 5 somitas, mientras que en *T. nigroviridis* y *T. rubripes* aparece en los estadios 1 somita y 6 somitas respectivamente. A partir de los siguientes pasos, el desarrollo de *S. annulatus* diverge más marcadamente de otros tetradontidos. El inicio de la formación del sistema nervioso, en sincronización con el desarrollo de los miómeros, los latidos del corazón, la eclosión, la hematopoesis y el desarrollo de los órganos implicados en el inicio de la alimentación exógena, indican los umbrales entre los pasos E6-E7, E7-E8, E8-E9 y E9-L1 (Larva 1) respectivamente. En *S. annulatus*, el desarrollo morfológico del sistema nervioso central muestra un patrón similar al de *T. nigroviridis* (Zaucker, *et al.*, 2014) y una regionalización similar a la de *D. rerio* (Kimmel, *et al.*, 1995), *O. latipes* (Iwamatsu, 2004) y *G. morhua* (Hall *et al.*, 2004). Desde el paso E6 (sincronización neuromuscular), el sistema nervioso central y periférico, tanto como las estructuras asociadas con la coordinación de los movimientos de nado requeridos para la vida libre, los pliegues de las aletas y los miómeros, iniciaron un desarrollo intenso. Los primeros latidos del corazón y la citodiferenciación del integumento iniciaron el paso E7 (inicio del funcionamiento del corazón). Durante este paso el ritmo cardiaco incrementa gradualmente, pero en los pasos E8 y E9 estos incrementan en 2 y 3.5 veces, respectivamente. Simultáneamente, fue observado un consumo más rápido del vitelo en los pasos E7 y

## Discusión

E8, mientras que en el paso E9, el consumo de los glóbulos de aceite fue acelerado. El consumo acelerado, tanto de vitelo y de los glóbulos de aceite, indican incremento en la demanda metabólica entre pasos. La intensa morfogénesis entre el paso E7 y E8 requieren los componentes nutricionales del vitelo para el anabolismo relacionado al desarrollo de tejidos y órganos; mientras que, después de la eclosión, la actividad muscular incrementa, lo que aumenta los requerimientos energéticos los cuales son cubiertos por el catabolismo principalmente por triglicéridos que componen los glóbulos de aceite, tal y como ocurre en embriones de otros teleósteos (Hoar y Randall, 1988; Rønnestad *et al.*, 1999). Desde el paso E7, la morfogénesis del integumento fue marcada. En este paso el integumento presentó un grosor de 1 a 2 células, que incluían células epiteliales planas, células globosas, cromatóforos, neuromastos y glándulas de eclosión. En *S. annulatus* la ubicación de cada tipo de cromatóforo varía conforme al desarrollo, pero presenta un patrón con pequeña variación intraespecífica. Los patrones de pigmentación son usados como una característica diagnóstica para la identificación taxonómica de los embriones de peces (Miller y Kendall, 2009); por lo tanto, esta descripción complementa la información existente para la identificación de embriones de tetraodontidos del Pacífico Este. Durante el paso E7, las glándulas de eclosión se localizaron en el vitelo y éstas desaparecieron justo después de la eclosión en el paso E8. De acuerdo a Inahaya *et al.* (1997), existen 4 tipos de patrones básicos de localización de las glándulas de eclosión: tipo 1) localizados en la epidermis del cuerpo embrionario y la región del vitelo; tipo 2) en la epidermis, ya sea del cuerpo embrionario o el vitelo; tipo 3) en el epitelio de la cavidad faríngeal y tipo 4) localizado de una manera que incluye los tipos 1 y 3. En el desarrollo de *S. annulatus* se observa distribución del tipo 2. A la fecha, las glándulas de eclosión no están descritas en otras especies tetraodontidos.

En *S. annulatus*, durante el paso E8, el proceso de eclosión ocurrió asincrónicamente y se alargó hasta aproximadamente 8 h. En contraste, Martínez-Palacios *et al.* (2002), para la misma especie, reportó un tiempo de eclosión de 25 h presentando una temperatura similar (27°C). Martínez-Rodríguez (2003, en Duncan y Abdo-de la Parra, 2002) menciona que el tiempo de tiempo de incubación para embriones de *S. annulatus* depende de la temperatura. La diferencia entre tiempos de eclosión quizás fue debida a la eliminación de la capa adherente que rodeaba al corión. Este proceso tiene como objetivo la eliminación de la adhesión del corión, de esta manera el corion se hace más delgado, esto permite al embrión romperlo más fácilmente y así reducir el tiempo de inicio de eclosión (Rodríguez-Ibarra *et al.*, 2010). Debido a esta eclosión temprana, los embriones eclosionaron con ojos sin

## Discusión

pigmentación, mientras que, en trabajos previos con la misma especie a 27-28°C y sin la eliminación de la adhesión del corión los embriones presentaron ojos completamente pigmentados (Martínez-Palacios *et al.* 2002; García-Gasca *et al.*, 2006). Sin embargo, cuando comparamos la edad en la cual la eclosión ocurre en este estudio, hay una diferencia de 10 h, lo cual indica que la eclosión puede ocurrir en diferentes estadios. Acorde a Balon (1990), los factores ambientales pueden causar que la eclosión suceda en diferentes estados de desarrollo en la misma especie, lo que se traduce como heterocronía intraspecífica (*sensu* Kováč, 2002). En otros tetraodontidos, la duración de la eclosión supera las 24 h (Uji *et al.*, 2011; Gallego *et al.*, 2017), sugiriendo que los eventos de heterocronía intraespecífica podrían ser comunes en la eclosión en esta familia como una respuesta adaptativa. La eclosión ocurrió durante la noche, en oscuridad, los organismos eclosionados mostraron fototaxis positiva y ocuparon la columna de agua. Esto indica que, aunque la retina no estaba completamente diferenciada (no pigmentada), los fotorreceptores ya tenían sensibilidad ante los estímulos de luz. Futuros estudios podrían ser implementados para confirmar los requerimientos de oscuridad para la sincronización de la eclosión, sabiendo que esto podría ser utilizado para la aplicación en la acuicultura.

Durante el paso E8, el desarrollo del saco vesicular dermal se hizo evidente. Esta estructura ha sido reportada para distinto orden de Tetraodontiformes (Leis, 1984). Sin embargo, la amplitud de esta estructura es menos evidentes en otros tetraodontidos, como en *T. nigroviridis* (Zaucker *et al.*, 2014). El saco vesicular dermal es homólogo del espacio dérmico lleno de fluido (seno dorsal, espacio perivitelino y pliegue de aleta) que se presenta en embriones libres de teleósteos marinos. Esto sugiere que el espacio subdermal tiene un papel en la flotación y la nutrición embrionaria en estas especies (Falk-Petersen, 2005). Ha sido propuesto que los nutrientes procedentes de la capa sincitial vitelina pasan directamente al espacio subdermal y de ahí son distribuidos al resto del embrión (Morrison, 1993). En *S. annulatus*, el saco vesicular dermal se expande durante el paso E8 y es reducido durante el paso E9. Esto coincide con el desarrollo del hígado que está en contacto directo con la capa sincitial vitelina, la vascularización sistemática y hepática, y el incremento del ritmo cardíaco en E9. En los embriones bentónicos de los teleósteos que presentan esta condición anatómica, ha sido demostrado que el hígado metaboliza los productos del vitelo que son digeridos por la capa sincitial vitelina y son distribuidos en todo el sistema vascular (Kunz, 2004). La vascularización del saco vitelino es típica de embriones bentónicos, el cual tiene funciones en el intercambio de gases, excreción, absorción y transporte de nutrientes del vitelo al hígado (Kunz, 2004).

## Discusión

Por lo tanto, el saco vesicular dermal podría cumplir una función tipo vascular en la distribución de nutrientes durante el paso E8 y el inicio del paso E9, el cual es funcionalmente reemplazado por el sistema cardiovascular en la transición del paso E9 al L1, ocurriendo como una parte de un proceso adaptativo de cambio de nicho.

## 9. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo se desprenden las siguientes conclusiones:

- Los cambios morfofuncionales que permiten la transición de un estado estabilizado a otro en el periodo embrionario son: combinación citoplasmática y reorganización de los gametos en cigoto (E1); el inicio de la división mitótica sincrónica del blastodisco (E1-E2); segmentación asincrónica del blastodisco y la formación de las tres capas celulares (E2-E3); inicio de epibolia y formación del eje embrionario y el anillo germinal (E3-E4); inicio de la formación de la somitas y el sistema nervioso central (E4-E5); la sincronización neuromuscular (E5-E6), los primeros latidos del corazón y la citodiferenciación del integumento (E6-E7); la eclosión (E7-E8), la hematopoyesis (E8-E9) y el inicio de la alimentación exógena (E9-L1).
- *S. annulatus* presenta ontogenia indirecta, con nueve pasos en el desarrollo embrionario.
- Comparado con otros tetraodontidos, *S. annulatus* es una de las especies más altriciales, debido al pequeño tamaño de huevos y de las larvas a la primera alimentación.
- Con base en las características del desarrollo embrionario, *S. annulatus* puede ser incluido en el gremio de los peces no protectores que desovan esparciendo sus huevos sobre rocas y gravas, con larvas pelágicas (litopelagofilos), dentro de la clasificación de los estilos reproductivos propuesta por Balon (1990).

## 10. LITERATURA CITADA

- Abdo-de la Parra, M. I., A. García-Ortega, I. E. Martínez-Rodríguez, B. González-Rodríguez, G. Velasco, C. Hernández y N. J. Duncan. 2001. Larval rearing of the Mexican bulls eye puffer *Sphoeroides annulatus* under hatchery conditions. In: Hendry C. I., G. Van Stappen, MWille & P Sorgeloos (eds). Contributed papers to Larvi'01 Fish & Shellfish Larviculture Symposium. *European Aquaculture Society Special Publication 30*: 4-7, Oostende.
- Abdo-de la Parra, M. I., I. E. Martínez-Rodríguez, B. González-Rodríguez, L. E. Rodríguez-Ibarra, N. Duncan y C. Hernández. 2012. Efecto de la temperatura y salinidad del agua en la incubación de huevos de botete diana *Sphoeroides annulatus*. *Revista de biología marina y oceanografía 47(1)*: 147-153.
- Abdo-de la Parra, M. I., L. E. Rodríguez-Ibarra, N. García-Aguilar, G. Velazco-Blanco y L. Ibarra-Castro. 2013. Biotecnología para la producción masiva de juveniles del botete diana *Sphoeroides annulatus*: inducción hormonal y cultivo larvario. *Revista de biología marina y oceanografía 48(3)*: 409-420.
- Álvarez-Cadena, J., N. R. Cortes-Altamarina y G. A. Mussot-Pérez. 1987. *Composición y abundancia de las larvas de peces en el sistema lagunar Huizache-Caimanera*, Parte II Tapo Botadero. Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM 15: 143-57.
- Álvarez-Rubio, M., F. Amezcua-Linares y A., Yáñez-Arancibia. 1984. *Ecología y estructura de las comunidades de peces en el sistema lagunar Teacapán-Agua Brava, Nayarit, México*. An. Inst. Cienc. Mar Limnol. Univ. Nal. Autón. México 13: 185-242.
- Amezcua-Linares, F. 1996. *Peces demersales de la plataforma continental del Pacífico central de México*. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad, México. 155 p.
- Arai, H. y S. Fujita. 1987. Spawning behavior and early life history of the Sharpnose Puffer, *Canthigaster rivulata*, in the aquarium. *Japanese Journal of Ichthyology 33(2)*: 194-202.
- Avanesov, A. y J. Malicki. 2010. The zebrafish model of the vertebrate retina. *Methods Cell Biol. 134*: 257-311.

## Literatura citada

- Balon, E. K. 1975. Terminology of intervals in fish development. *J. Fish. Res. Board Can* 32: 1663-1670.
- Balon, E. K. 1986. Types of feeding in the ontogeny of fishes and the life history model. *Environmental Biology of Fishes* 16: 11- 24.
- Buesa, R. J. y M. V. Peshkov. 2009. Histology without xileno. *Annals of Diagnostic Pathology* 13: 246-256.
- Balon, E. K. y C. Flegler-Balon. 1985. Microscopic techniques for studies of early ontogeny in fishes: problems and methods of composite descriptions. ISBN: 90 6193-514 8.
- Balon, E. K. 1990. Epigenesis of an epigeneticist: the development of some alternative concepts on the early ontogeny and evolution of fishes. *Guelph Ichthyology Reviews* 1: 1-42.
- Balon, E. K. 2002. Epigenetic processes, when *natura non facit saltum* becomes a myth, and alternative ontogenies a mechanism of evolution. *Environmental Biology of Fishes* 65: 1-35.
- Carvallho, L. y C. P. Heisenberg. 2010. The yolk syncytial layer in early zebrafish development. *Trends in Cell Biology*. Doi: 10.1016/j.tcb.2010.06.009.
- Castro-Aguirre, J. L., H. Espinoza-Pérez y J. J. Schmitter-Soto. 1999. *Ictiofauna estuariana, lagunar y vicarial de México*. Testigo Limusa. México. 666 pp.
- Chen, Y. F. 2005. Induced ovulation and embryonic development of ocellated puffer, *Takifugu ocellatus*. *J. Appl. Ichthyol.* 21: 136–140.
- Collazo, A., J. A. Bolker, y R. Keller. 1994. A phylogenetic perspective on teleost gastrulation. *The American Naturalist* 144: 133–152.
- Coronado-Molina, C. y F. Amezcua-Linares. 1988. *Distribución y abundancia de los peces demersales de la costa de Guerrero en el Pacífico de México*. An. Inst. Cienc. Mar Limnol. Univ. Nal. Autón. México 15: 67-93.
- Cunningham, J. E. R. y E. K. Balon. 1985. Early ontogeny of *Adinia xenica* (Pisces, Cyprinodontiformes): 1. The development of embryos in hiding. *Environmental Biology of Fishes* 14: 115–166.
- Díaz-Guevara, R. 2009. *Biología reproductiva del botete diana Sphoeroides annulatus en la Ensenada de la Paz, Baja California Sur, México*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B.C.S., México.

## Literatura citada

- Duncan, N. y I. Abdo-de la Parra. 2002. Marine fish specialists focus on puffer fish. *World Aquaculture* 33(3): 34-38.
- Duncan, N. J., G. A. Rodríguez-Montes de Oca, D. Alok y Y. Zohar. 2003. Effects of controlled delivery and acute injections of LHRHa on bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus*) spawning. *Aquaculture* 218: 625-635.
- Eschmeyer, W. N. y J. D. Fong. 2016. <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>. Catalogue of fishes: species by family/subfamily. Online versión. Fecha de consulta: 06 de diciembre del 2016.
- Fischer, W., F. Frupp, W. Schnsider, C. Sommer, K. E. Carpenter y V. H. Niem. 1995. *Guía FAO para la identificación de especies para fines de la pesca*. Food and Agricultural Organization, Roma. 3: 1629-1637.
- Falk-Petersen, I. B. 2005. Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish. *Fish and Shellfish Immunology* 19: 397-412.
- Froese, R. y D. Pauly. Editors. 2016. [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org). FishBase. World Wide Web electronic publication. Fecha de consulta: 12 de noviembre del 2016.
- Fujita, S. y M. Shinohara. 1986. Development of eggs, larvae and juveniles of the puffer, *Takifugu chrysops*, reared in the laboratory. *Japanese Journal of Ichthyology* 33(2): 186-194.
- Gallego, V., M. Yoshida, D. Kurokawa, J. F. Asturiano y G. J. Fraser. 2017. Embryonic development of the grass pufferfish (*Takifugu niphobles*): from egg to larvae. *Theriogenology* 90: 191-196.
- García-Gasca, A., M. A. Galaviz, J. N. Gutiérrez y A. García-Ortega. 2006. Development of the digestive tract, trypsin activity and gene expression in eggs and larvae of the bullseye pufferfish *Sphoeroides annulatus*. *Aquaculture* 251: 366-367.
- García-Ortega, A., E. García-Pagés, G. Velasco, G. Dunstan y M. Brown. 2003. Growth and survival of bullseye puffer *Sphoeroides annulatus* larvae fed *Artemia* enriched with highly unsaturated fatty acids. Resúmenes de la International Conference World Aquaculture 2003. Mayo 19-23. Salvador, Brazil.
- Hall, T. E., P. Smith y I. A. Johnston. 2004. Stages of embryonic development in the Atlantic cod *Gadus morhua*. *Journal of Morphology* 259: 255-270.

## Literatura citada

- Hoar, W. S. y D. J. Randall. 1988. *The physiology of developing fish*. Volume XI. Part A. Eggs and larvae. ISBN: 0 12-350433 3.
- Inohaya, K., S. Yasumasu, K. Araki, K. Yamazaki, I. Yasumasu, I. Luchi y K. Yamagami. 1997. Species-dependent migration of fish hatching glands cells that commonly express astacin-like proteases in common. *Development, Growth and Differentiation* 39: 191-197.
- Iwamatsu, T. 2004. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mechanisms of Development* 121: 605–618.
- Jang, S. I., W. Kang y H. K. Han. 1996. Embryonic, larval and juvenile stages in yellow puffer, *Takifugu obscurus*. *Journal of Aquaculture* 1: 11-18.
- Kimmel, C. B. y R. D. Law. 1985. Cell lineage of zebrafish blastomeres 1: cleavage patterns and cytoplasmatic bridges between cells. *Developmental Biology* 108: 78–85.
- Kimmel, C. B., W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann y T. F. Shilling. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203: 253-310.
- Kováč, V. 2000. Early development of *Zingel streber*. *Journal of Fish Biology* 57: 1381–1403.
- Kováč, V. 2002. Synchrony and Heterochrony in Ontogeny (of fish). *J. theor. Biol.* 217: 499–507.
- Kunz, Y. W. 2004. *Developmental Biology of teleost fishes*. 645 pp.
- Leis, J. M. 1984. Tetraodontoidei: development. In H. G. Moser, W. J. Richards, D. M. Cohen, M. P. Fahay, A. W. Kendall & S. L. Richardson (eds). *Ontogeny and systematics of fishes* (pp. 447–450). Lawrence: American Society of Ichthyology and Herpetology, Special Publication.
- Lentz, T. L. y J. P. Trinkaus. 1967. A fine structural study of cytodifferentiation during cleavage, blastula, and gastrula stages of *Fundulus heteroclitus*. *The Journal of Cell Biology* 32: 121-138.
- Maeda-Martinez, A. N. 1981. *Composición, abundancia, diversidad y alimentación de la ictiofauna, en tres lagunas costeras del Golfo de California*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México. 140 p.

## Literatura citada

- Martínez-Brown, J. M. 2012. *Hibridación como un mecanismo de cambio de trayectorias ontogénicas: comparación de la ontogenia de *Paralabrax maculatofasciatus*, y de *P. nebulifer* (Serranidae) y la de sus híbridos*. Tesis de doctorado, CICIMAR-IPN. La Paz B.C.S, México. 151 pp.
- Martínez-Chávez, C., N. García-Aguilar y N. J. Duncan. 2003. Comparison of egg quality between wild and captive bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*). *Fish Physiology and Biochemistry* 28: 509-510.
- Martínez-Palacios, C., C. Chávez-Sánchez, G. S. Papp, M. I. Abdo-de la Parra y L. Ross. 2002. Observations on spawning, early development and growth of the puffer fish *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1843). *Journal of Aquaculture in the Tropics* 17(1): 59-66.
- Morrison, C. M. 1993. *Histology of the Atlantic cod, *Gadus morhua*: an atlas*. Part 4. Eleutheroembryo and larva. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences 119: 1–496.
- Morrison, C. M., T. Miyake y J. W. Wright Jr. 2001. Histological study of the development of embryo and early larva of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). *Journal of Morphology* 274: 172-176.
- Muñetón-Gómez, M. S., F. M. Vallejo y M. G. García. 2000. *Manual de técnicas histológicas aplicadas a organismos acuáticos*. Primera Edición. México. 81 pp.
- Nelson J., T. Grande y M. H. Wilson. 2016. *Fishes of the world* (5<sup>th</sup> edition). Wiley, New Jersey, 752 pp.
- O'Connell, C. P. 1981. Development of organ systems in the northern anchovy, *Engraulis mordax*, and other teleosts. *Amer. Zool.* 21: 429-446.
- Ocampo-Peraza, D. 1983. El botete (*Sphoeroides annulatus*), características y origen como alimento humano. *Rev. Cienc. Mar* 5: 9-11.
- Oliveira, J.S., S.C. Rego-Fernandes, C.A. Schwartz, C. Bloch Jr., J.A. Taquita Melo, O.R. Pires Jr. y J.C. de Freitas. 2006. Toxicity and toxin identification in *Colomesus asellus*, an Amazonian (Brazil) fresh water puffer fish. *Toxicon* 48: 55–63.

## Literatura citada

- Rønnestad, I., A. Thorsen, y R. N. Finn. 1999. Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acid. *Aquaculture* 177: 201-216.
- Robertson, D. R. y R. A. Gerald. 2015. <http://biogeodb.stri.si.edu/sfstep/es/pages> . Peces costeros del Pacífico Oriental Tropical: sistema de información en línea. Versión 2.0. Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales, Balboa, República Dominicana. Fecha de consulta: 08 de diciembre del 2016.
- Rodríguez-Ibarra, L. E., M. I. Abdo-de la Parra, G. A. Rodríguez-Montes de Oca, M. S. Moreno-Hernández, G. Velasco-Blanco, N. García-Aguilar y L. S. Álvarez-Lajonchère. 2010. Evaluación de métodos para la eliminación de la capa adherente de los huevos del botete diana *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1842). *Revista de biología marina y oceanografía* 45(1): 147-151.
- Sabrah, M. M., A. A. El-Ganainy y M. A. Zaky. 2006. Biology and toxicity of the puffer fish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) from the Gulf of Suez. *Egyptian Journal of Aquatic Research* 32: 283–297.
- Sánchez-Cárdenas, R. 2007. *Estrategia reproductiva de Sphoeroides annulatus (Jenyns, 1842) (Tetraodontidae) en la costa de Mazatlán, Sinaloa, México*. Tesis de Maestría, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz, Baja California Sur. 99 p.
- Sánchez-Cárdenas, R., M. Arellano-Martínez, M. C. Valdez-Pineda, R. E. Morán-Angulo y B. P. Ceballos-Vázquez. 2011. Reproductive cycle and sexual maturity of *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1842) (Tetraodontiformes, Tetraodontidae) from the coast of Mazatlán, Sinaloa, México. *Journal of Applied Ichthyology* 27(5): 1190–1196.
- Sarasquete, C. y M. Gutiérrez. 2005. New Tetrachromic VOF Stain (Type III-G.S) for normal and pathological fish tissues. *European Journal of Histochemistry* 49(2): 105-114.
- Shardo, J. D. 1995. Comparative embryology of teleostan fishes 1, development and staging of the American shad, *Alosa sapidissima* (Wilson, 1811). *Journal of Morphology* 225: 125-167.

## Literatura citada

- Stuardo, J. y A. Martínez. 1974. *Relaciones entre algunos factores ecológicos y la biología de poblaciones de Crassostrea corteziensis Hertlein, 1951, de San Blas, Nayarit, México*. An. Inst. Cienc. Mar Limnol. Univ. Nal. Autón. México 2: 89-129.
- Thomson, D. A. 1978. *Peces del Golfo de California*. Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, México. 68 p.
- Thomson, D., L. Findley y Y. A. Kerstitch. 1987. *Reef fishes of the Sea of Cortez. The rocky-shore fishes of the Gulf of California*. The University of Arizona Press Tucson, AZ. 407 p.
- Trinkaus, J. P. 1993. The Yolk Syncytial Layer of *Fundulus*: Its origin and history and its significance for early embryogenesis. *The Journal of Experimental Zoology* 265: 258-284.
- Trinkaus, J. P. y T. L. Lentz. 1967. Surface specializations of *Fundulus* cells and their relation to cell movements during gastrulation. *The Journal of Cell Biology* 32: 139-153.
- Tsai, H. Y., M. Chang, S. C. Liu, G. Abe y K. G. Ota. 2013. Embryonic development of goldfish (*Carassius auratus*): a model for the study of evolutionary change in developmental mechanism by artificial selection. *Developmental Dynamics* 242(11): 1262-1283.
- Uji, S., T. Kurokawa, H. Hashimoto, T. Kasuya y T. Suzuki. 2011. Embryonic staging of fugu, *Takifugu rubripes*, and expression profiles of *aldh1a2*, *aldh1a3* and *cyp26a1*. *Develop* 53: 715-725.
- Valbuena-Villarreal, R. D., B. E. Zapata-Berruecos, C. R. Ruales y P. E. Cruz-Casallas, 2012. Desarrollo embrionario del capaz *Pimelodus grosskopfii* (Steindachner, 1879). *Int. J. Morphol.* 30: 150-156.
- Valdez-Pineda, M. C., R. E. Morán-Angulo, D. Voltolina y S. Castillo-Vargasmachuca. 2014. Population structure and reproductive aspects of puffer fish *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1842) (Osteichthyes: Tetraodontidae), landed in Teacapán, Sinaloa, México. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 42(1): 121-126.

## Literatura citada

- Warga, R. M. y C. B. Kimmel. 1990. Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish. *Development* 108: 569-580.
- Watson, W. 1996. Tetraodontidae. In H. G. Moser (ed), *The early stages of fishes in the California current region*, CalCOFI atlas no. 33 (pp 1428–1433). Lawrence: Allen Press.
- Wilson, H. V. 1889. *The embryology of sea bass (Serranus atrarius)*. Bulletin of U. S. Fish Commission 9: 209–278.
- Yañez-Arancibia, A. 1977. *Patrones ecológicos y variación cíclica de la estructura trófica de las comunidades nectónicas en lagunas costeras del Pacífico de México*. An. Inst. Cienc. Mar Limnol. Univ. Nal. Autón. México 5: 287-307.
- Zaucker, A; T. Bodur, H. Roest Crolius, Y. Hadzhiev, J. Gehrig, F. Loosli, C. Watson y F. Muller. 2014. Description of embryonic development of spotted green pufferfish (*Tetraodon nigroviridis*). *ZEBRAFISH*, Volume 00, Number 00.

## Literatura citada

## Literatura citada

## Literatura citada