

Research Article

Descripción histológica comparativa del desarrollo del sistema digestivo y visual de larvas de chame *Dormitator latifrons* (Pisces: Eleotridae)

Vanesa V. López-López¹, Gustavo A. Rodríguez M. de O.¹, Mario A. Galavíz²
Cristóbal Román Reyes¹, Eva A. Medina-Hernández¹, Konrad Dabrowski³ & María C. Haws⁴

¹Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, Mazatlán, Sinaloa, México

²Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California
Ensenada, Baja California, México

³School of Environment and Natural Resources, The Ohio State University, Columbus, Ohio, USA

⁴Pacific Aquaculture and Coastal Resources Center, University of Hawaii-Hilo, Hawaii, USA

Corresponding author: Gustavo A. Rodríguez M. de O. (grodriguez@uas.edu.mx)

RESUMEN. Se realizó la descripción del desarrollo de larvas de uno a seis días post-eclosión (dpe), para generar información que ayude a comprender la capacidad alimenticia en etapas tempranas. Las larvas se obtuvieron mediante la inducción hormonal de reproductores, utilizando implantes de análogos sintéticos de GnRH durante la temporada de septiembre-noviembre de 2010. Las muestras fueron incluidas en historesina y teñidas con hematoxilina-eosina. Una vez eclosionada, la larva presenta gran cantidad de vitelo que absorbe gradualmente (1° a 3° dpe). Al 4° dpe, existe una cavidad bucal abierta con estructuras dentales, en este estadio se ha completado el desarrollo ocular, que presenta pigmentación. Se observa la formación de las hendiduras branquiales y se diferencia el intestino en anterior y posterior y se distingue la presencia de vacuolas digestivas en el intestino anterior. En el 5° dpe, se observaron los paquetes de fibras musculares y se distinguió una estructura estomacal. En el 6° dpe, el páncreas, pliegues intestinales y membrana de borde de cepillo son visibles y se observaron partículas de alimento y bacterias dentro del intestino. En base a lo anterior, se concluye que las larvas de *D. latifrons* han desarrollado completamente el tracto digestivo y órganos asociados que le ayudarán a la búsqueda de alimento, entonces a partir del 4° dpe son capaces de iniciar la alimentación exógena.

Palabras clave: *Dormitator latifrons*, chame, larvas, ontogenia, sistema digestivo, acuicultura, México.

Comparative histological description of the digestive and visual system development of larval chame *Dormitator latifrons* (Pisces: Eleotridae)

ABSTRACT. This study was focused on the morphological description of chame larvae from one to six days post-hatching (dph), in order to generate information that helps understanding their feeding ability in early stages. The larvae were obtained by hormonal induction of a broodstock, using implants of GnRH synthetic analogues, during the spawning season from September to November 2010. The samples were included in historesin, and stained with hematoxylin-eosin. It was described that, once the larva hatched has a large amount of yolk it is gradually absorbed (from 1 to 3 dph). At day four, there is an open oral cavity with dental structures, the eye development is complete and there was pigmentation on it, the gills are observable and the foregut was differentiated in anterior and posterior intestine, showing the presence of digestive vacuoles in the anterior intestine. By five dph the larvae has developed muscle fibers and a structure identified as the stomach. At sixth dph, it is possible to identify the pancreas, the intestinal folds, and the brush border membrane, and there were food particles and bacteria rests in the gut. Based on the above, it is concluded that the larvae of *D. latifrons* from the fourth dph fully developed organs and systems that help the search of food, so they are capable of starting with exogenous feeding.

Keywords: *Dormitator latifrons*, chame, larvae, ontogeny, digestive system, aquaculture, Mexico.

Corresponding editor: Guido Plaza

INTRODUCCIÓN

La necesidad de expandir el número de especies de peces para acuicultura es de alta relevancia dada la

contribución mundial de la acuicultura a la producción de organismos acuáticos. El chame *Dormitator latifrons* es una especie con varias características deseables como su tolerancia a variaciones de sali-

nidad, temperatura y oxígeno disuelto, además de ser resistente a la manipulación, lo que lo hace una excelente opción para la acuicultura (Bonifáz *et al.*, 1985). En algunos estados del sur y sureste de México, es utilizado para consumo humano y como carnada (Reséndez, 1973; Larumbe, 2002). En Ecuador tiene grandes expectativas de comercialización y representa una fuente alternativa de empleo (Navarro-Rodríguez *et al.*, 2004; Castro-Rivera *et al.*, 2005). Sin embargo, para desarrollar su cultivo es necesario producir una cantidad suficiente de larvas y lograr su desarrollo hasta el momento de la siembra de juveniles. Los esfuerzos de investigación en Ecuador y México en los últimos 20 años se han enfocado a determinar las condiciones que logren la supervivencia y crecimiento de larvas para plantear una o varias estrategias de alimentación larvaria y generar los juveniles en masa de chame necesarios para la expansión de su cultivo de forma similar al conocimiento generado para otros peces, principalmente larvas de peces marinos (Ueberschär, 1988).

Un aspecto importante en el crecimiento larvario, una vez que se está efectuando la transición de alimentación endógena a exógena, es el desarrollo del tracto digestivo, que le permitirá a la larva el aprovechamiento del alimento para su crecimiento. Para realizar con eficiencia estos cambios, las larvas deben estar capacitadas para ingerir y utilizar el alimento. No obstante, en la mayoría de las especies, el sistema digestivo de las larvas es morfológica, histológica y fisiológicamente menos desarrollado que el de los adultos (Govoni *et al.*, 1986). Por lo tanto, la capacidad de las larvas para digerir algunos componentes lipídicos y proteicos de las dietas no está claramente definida, ya que de inicio las larvas de peces no tienen bien desarrollado su sistema digestivo y su capacidad para secretar enzimas digestivas, que ayuden a la digestión de los nutrientes, no está bien definida en muchas especies, incluyendo el chame (Govoni *et al.*, 1986; Zambonino-Infante & Cahu, 2001; Rivera & Botero, 2009). La diferenciación del tracto digestivo en las larvas de peces es una parte crucial para el inicio de la alimentación exógena (O'Connell, 1981), por lo que es importante identificar el estado de desarrollo morfológico en que se encuentra al inicio de la alimentación exógena. Asimismo, la interacción de los peces con su medio ambiente se relaciona directamente con sus órganos de los sentidos (Sandstrom, 1999) y el comienzo de la alimentación exógena en las larvas de peces requiere el desarrollo simultáneo de los órganos y sistemas relacionados con la búsqueda de las presas para la ingesta, es decir, los sistemas visual y digestivo (Peña *et al.*, 2003). Existen diferencias notables en el grado de desarrollo del ojo en peces de agua dulce, ya

que por lo general este órgano está mucho más desarrollado al momento de la eclosión comparado con las larvas de peces de ambientes marinos (Fuiman & Magurran, 1994). Por ejemplo, en el besugo *Pagrus pagrus* no se observa un sistema visual funcional al momento de la eclosión, pero el desarrollo de esta estructura coincide con el progreso de la funcionalidad del tracto digestivo, ya que al igual que en otras larvas de peces, la alimentación es un proceso visual en cuanto a la localización e ingesta de la presa (Roo *et al.*, 1999), siendo de alta relevancia que tanto el sistema digestivo como el ojo presenten cierto grado de desarrollo al inicio de la alimentación exógena (Govoni *et al.*, 1986).

El conocimiento de la morfología y funcionalidad del tracto digestivo en larvas de peces, es muy relevante ya que de esta forma se establecen indicios sobre la factibilidad de ofrecer alimento, ya sea vivo o inerte, para lograr el inicio de la alimentación exógena (Gisbert *et al.*, 2004). Una de las herramientas disponibles para este fin son los estudios a nivel histológico para describir el desarrollo temprano de los órganos y arreglos celulares que se presentan en los primeros días de vida de un pez, durante y posteriormente a la absorción del saco vitelino (Sanchez-Amaya *et al.*, 2007). Una vez establecido lo anterior, es viable establecer comparaciones con otros peces y hacer conclusiones preliminares sobre el posible camino a seguir en cuanto a establecer un esquema de alimentación adecuado para lograr el larvicultivo de un pez en particular (Kolkovski, 2001). Como trabajo previo con chame se han realizado estudios donde se ha comprobado que el uso de análogos sintéticos de GnRH y LHRH son una herramienta útil en la reproducción de *D. latifrons* al obtener gametos viables (Rodríguez-Montes de Oca *et al.*, 2011), además, en experimentos realizados con larvas *in vivo* se ha observado actividad mandibular a partir del tercer día post-eclosión dpe (Rodríguez-Montes de Oca *et al.*, 2012). Es importante señalar que el chame es un pez agástrico; este es un hecho esencial ya que de acuerdo a lo señalado por Liu *et al.* (2013), la mayoría de este tipo de trabajos están enfocados a la descripción del desarrollo temprano de peces que eventualmente presentan un estómago funcional, hecho que posteriormente favorece la transición del uso de alimento vivo a dietas artificiales en un menor tiempo. Por lo tanto, para contribuir al conocimiento de la especie, en el presente trabajo, se realizó la descripción morfológica del estado de desarrollo del sistema digestivo y visual de las larvas de *D. latifrons* durante los primeros 6 dpe y así generar información requerida para establecer si las larvas cuentan con órganos u otras estructuras asociadas para la captura y procesamiento del alimento al inicio de la alimentación exógena y

contribuir al desarrollo de protocolos de alimentación para garantizar la supervivencia larval, dado que hasta este momento no existe información al respecto y no se ha logrado la producción de larvas de chame en condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las larvas

Para el análisis histológico, se utilizaron larvas de *D. latifrons* obtenidas de un stock de reproductores mantenido en cautiverio durante 1 a 2 años en las instalaciones de la Facultad de Ciencias del Mar (FACIMAR-UAS, Mazatlán Sinaloa, México). Los reproductores se indujeron al desove mediante la utilización de implantes de análogos sintéticos de GnRH a una concentración de 75 µg por hembra (Ovaplant, Syndel, Canadá) en la temporada 2010 (septiembre-noviembre). Posteriormente, se extrajeron los gametos, se realizó la fertilización artificial y se distribuyeron los huevos en contenedores plásticos transparentes de 1 L con agua filtrada (3 µm y filtro UV), aireación y temperatura constantes (26°C). Una vez eclosionadas, las larvas fueron reubicadas en tanques de 3 L a una densidad de 50 larvas L⁻¹ y se alimentaron con una combinación de las microalgas *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. y el probiótico Epicin (Epicore Bionetworks Inc. EUA) (Medina-Hernández, 2012), colectando larvas de 1, 2, 4, 5 y 6 dpe para su posterior análisis histológico.

Fijación

Las larvas se extrajeron de los tanques de alimentación filtrando un volumen de 100-150 mL por contenedor con un tamiz de 100 µm y se colocaron en 1,5 mL de solución de paraformaldehído al 4% en un vial de polietileno Eppendorff, se refrigeraron en esta solución y finalmente se les cambió a solución amortiguadora de Sorensen como conservador previo para su envío a Ohio State University, School of Environment and Natural Resources, en Columbus, Ohio, USA.

Para la inclusión de las muestras se prepararon 200 mL de resina (monómero de glicol metacrilato), se añadieron dos sobres de catalizador (un sobre de peróxido de benzoico por cada 100 mL) y se introdujo un agitador magnético. El vaso de precipitado que contenía la mezcla se colocó sobre una cápsula de Petri con hielo y finalmente se agitó, con ayuda de un plato agitador a temperatura ambiente. Una vez mezclada la resina se procedió a separarla en contenedores de cristal transparente marcados como: Alcohol+Resina (1:1, alcohol 95%, resina recién preparada), Resina I, Resina

II, y Resina para inclusión y se mantuvieron refrigeradas. Una vez preparado lo anterior se siguió el procedimiento indicado en la Tabla 1.

Tabla 1. Procedimiento de inclusión de las muestras en historesina.

Reactivo	Tiempo
Alcohol 80%	1 h
Alcohol 95%	3 h
Alcohol + resina 1:1	4 h
Resina I (pura)	4 h o toda la noche
Resina II (pura)	4 h

Preparación de los moldes y cortes de los bloques

Para preparar los bloques se utilizó la resina de inclusión a la cual se agregó endurecedor (derivado de ácido barbitúrico), a razón de 1 mL por cada 15 mL de resina a temperatura ambiente. Para la fabricación de los bloques se utilizaron moldes de silicón de 7x14x4 mm de profundidad, los cuales, con un estereoscopio fueron parcialmente rellenados con resina, se colocaron 3 larvas en posición dorso-lateral por molde y se continuó con el llenado del mismo. Una vez realizado el procedimiento se marcaron las muestras y se colocaron en una estufa Thelco 11467 a 37°C durante 12 h.

Una vez obtenidos los bloques con las muestras se efectuaron los cortes histológicos, utilizando un micrótopo automático Leica, modelo RM2265 con cuchillas de cristal. Se realizaron cortes longitudinales y transversales de 3 µ de grosor y se colocaron en portaobjetos con agua destilada previamente etiquetados, una vez extendido el corte, se extrajo el exceso de agua y se colocaron sobre una plancha caliente (~30°C) por unos segundos para evaporar el agua, finalmente, se retiraron del calor y se dejaron secar por 24 h antes de agregar la tinción.

Tinción y toma de imágenes digitales

Para la tinción de los cortes se utilizó el método de hematoxilina-eosina (hematoxilina I Cardinal Health® lista para usarse y eosina base agua al 2,5%). Se colocaron las láminas en contenedores de cristal con tapa y se tiñeron como se indica en la Tabla 2.

Finalmente, las láminas se dejaron secar durante 4-5 h, se montaron con Permout (Fisher Scientific® mounting medium) y se dejaron secar durante 24 h para su posterior análisis al microscopio y toma de fotografías con un microscopio compuesto (Amscope, modelo 109126) 100x y 400x de magnificación. Para la captura de imágenes digitales se utilizó el programa Motic Images Plus 2.0.

Tabla 2. Protocolo de tinción hematoxilina-eosina.

Reactivo	Tiempo
Agua corriente	5 min
Hematoxilina	3 min
Agua corriente	Lavado rápido
Eosina	2 min
Agua corriente	Lavado rápido

RESULTADOS

Desarrollo del sistema digestivo

Al momento de la eclosión las larvas del chame presentan un tracto digestivo sencillo en forma de tubo con células indiferenciadas que descansa dorsalmente sobre el saco vitelino, que se encuentra cerrado al exterior (boca y ano) (Fig. 1a) y una aleta dorsal primitiva (Fig. 1b). A 2 dpe, la larva presentó cambios significativos en la maduración de órganos involucrados en la digestión del alimento como esófago e intestino, pues se apreció la formación de un canal donde el día anterior solo se observaba el saco vitelino y se distingue el giro o circunvolución característico que originará la división que formará la región posterior y anterior del intestino. Además, se observó una abertura que corresponde al inicio de la apertura de la boca y se dirige (de derecha a izquierda) hacia la región que formará el canal bucofaríngeo que se identifica como la cavidad bucal de la larva y aún se encuentra presente el saco vitelino. La boca y ano no están desarrollados por completo, lo que indica que la larva aún no está preparada para su alimentación exógena (Fig. 2a). La absorción del saco vitelino ocurrió entre el 3° y 4° dpe, observándose cambios importantes en el sistema digestivo de las larvas. El lumen intestinal es visible, con pliegues intestinales rudimentarios en su interior y en la capa más externa del mismo, que

presenta proyecciones (borde de cepillo) y células epiteliales ciliadas con núcleos basales definidos y vacuolas supranucleares en desarrollo. Adicionalmente, se observa la formación del ducto urinario y aparentemente, el grupo de células que podrían formar la vejiga natatoria, intestino, hígado 4° dpe. Así mismo, fueron visibles las células basófilas del páncreas exocrino difuso, órgano importante, que será el principal secretor de enzimas digestivas (Fig. 2b).

Las larvas muestran la ingestión de partículas de las dietas ofrecidas a partir del 4 dpe (Fig. 3b), además que el 100% de las larvas tenía la boca abierta y funcional. Al 5° y 6° dpe (Figs. 4a, 4b), se observó el esófago bien desarrollado y se distinguió un abultamiento en el intestino anterior, como una extensión del esófago. El hígado continuó desarrollándose e incrementando su tamaño. También se determinaron células exocrinas del páncreas embebidas entre los diferentes órganos; otras estructuras visibles al 5° y 6° dpe son el conducto urinario relacionado con el ano, riñón embrionario (pronefros) y corazón. Las glándulas gástricas no fueron identificadas en las larvas procesadas hasta en el 6° dpe y se observó una extensión del esófago indicando la formación de saco, en posición anterior al intestino. En esta misma etapa se observó la aparición de células de la mucosa del esófago que posteriormente incrementan en número, como también el aumento en el tamaño del hígado (Fig. 4b).

Desarrollo del sistema visual

Al momento de la eclosión (1° dpe), la retina de las larvas fue indiferenciada. El lente empieza a desarrollarse cuando se observan paquetes celulares que formarán el tejido ocular. La retina se encuentra rodeada por la esclerótica, compuesta por células no diferenciadas en disposición concéntrica, sin estratificación evidente en esta etapa del desarrollo (Fig. 5a).

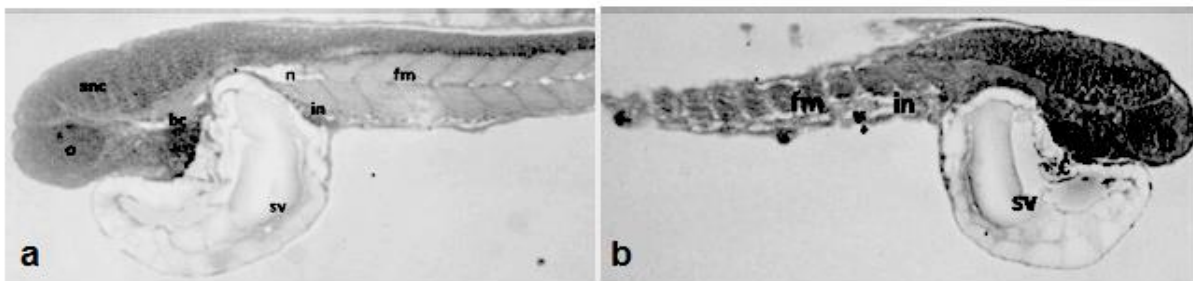


Figura 1. Corte longitudinal de larvas de chame. a) 1dpe, b) 2 dpe, (20x). bc: canal bucofaríngeo, c: corazón, fm: fibras musculares, in: intestino primordial, n: notocordio, o: ojo, snc: sistema nervioso central, sv: saco vitelino. Tinción hematoxilina-eosina.

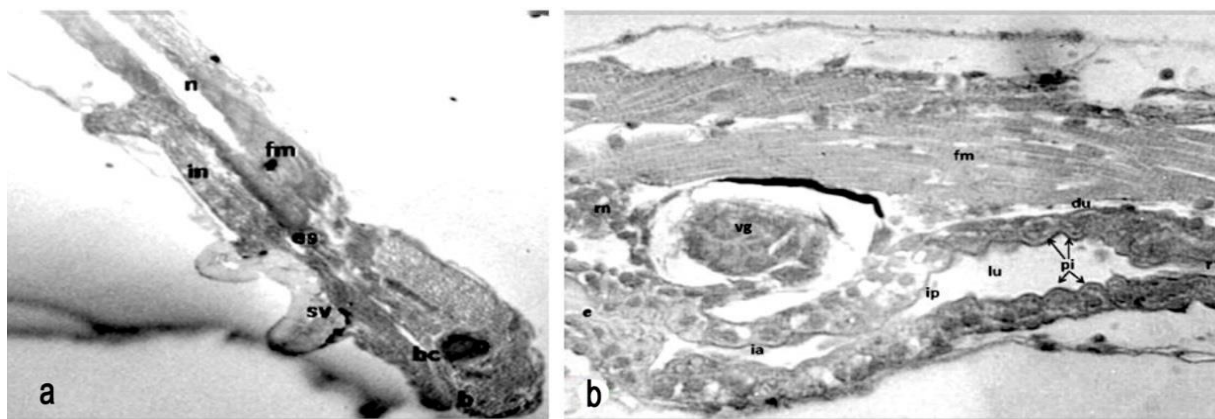


Figura 2. Corte longitudinal de larvas de chame. a) 2 dpe (20x), b) 4 dpe (40x). a: ano, b: boca, bc: canal bucofaríngeo, du: ducto urinario, es: esófago, fm: fibras musculares, ia: intestino anterior, in: intestino, ip: intestino posterior, lu: lumen, o: ojo, pi: pliegues intestinales rudimentarios, r: recto, rn: riñón cefálico, sv: saco vitelino, vg: vejiga gaseosa. Tinción hematoxilina-eosina.

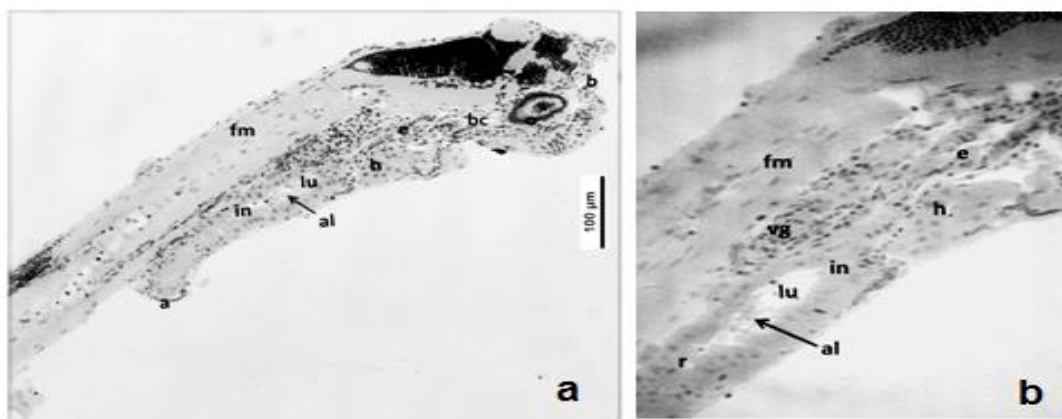


Figura 3. Corte longitudinal de larvas de chame de 4 dpe (40x). a) Larva completa de chame, b) sistema digestivo de larvas de chame. a: ano, al: residuos de alimento, b: boca, bc: bucofaríngeo, e: esófago, h: hígado, vg: vejiga gaseosa. Tinción hematoxilina-eosina.

A partir del 2º dpe, se observó un avance notable en el desarrollo visual del organismo, como algunos cambios en la estratificación de la retina que originaron cinco capas retinianas, nombradas de la parte más interna a la externa como: capa plexiforme interna, capa nuclear interna, capa plexiforme externa, algunas células fotorreceptoras y finalmente, la formación de los segmentos externos de los conos (Fig. 5b). La capa nuclear interna consistió en una hilera de segmentos nucleares de los conos individuales en desarrollo, las capas plexiformes consisten en las dendritas de las neuronas situadas en las capas interiores del núcleo celular y del ganglio, y la capa de células ganglionares compuesta de varias hileras de células redondas. Durante los siguientes días (3º y 4º dpe), el sistema

visual de las larvas continuó su desarrollo hasta llegar a su total maduración al 5º dpe y es posible identificar con precisión las diferentes capas que conforman una retina bien desarrollada, tales como el lente, capa plexiforme interna, capa nuclear interna, plexiforme externa y epitelio pigmentado (Fig. 6).

DISCUSIÓN

Existen numerosas investigaciones sobre el desarrollo larvario de peces, que incluyen observaciones de la ontogenia temprana, histomorfología y cuantificación de macromoléculas proteicas, lipídicas y enzimáticas (Cousin *et al.*, 1986; Vazquez *et al.*, 1994; Moyano *et al.*, 1996). Las primeras semanas de desarrollo son un

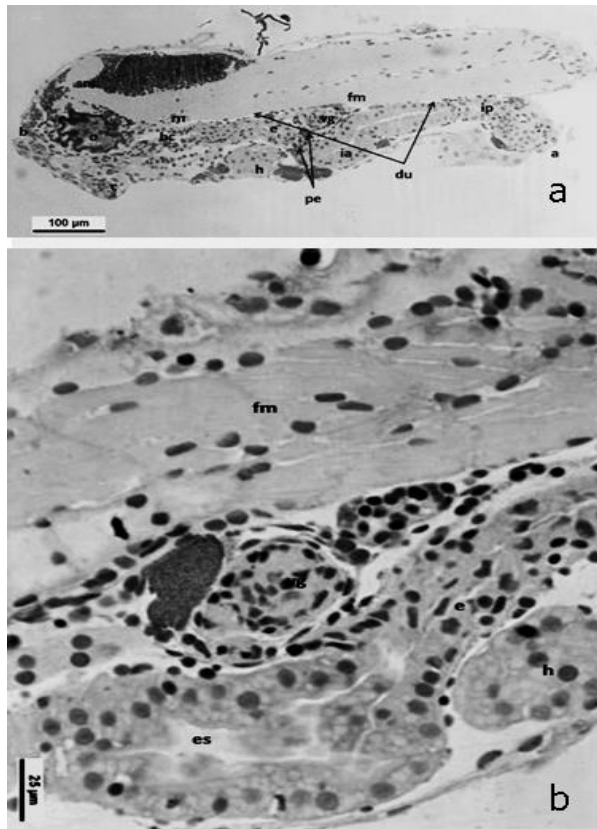


Figura 4. Cortes longitudinales de larvas de chame. a) 5 dpe, b) 6 dpe. a: ano, b: boca, bc: conducto bucofaríngeo, c: corazón, du: ductos urinarios, e: esófago, es: bolsa pseudoestomacal, fm: fibras musculares, h: hígado, ia: intestino anterior, ip: intestino posterior, o: ojo, pe: páncreas exocrino, rn: riñón embrionario, vg: vejiga gaseosa. Tinción hematoxilina-eosina.

periodo crítico para las larvas de peces, particularmente cuando termina la fase lecitotrófica y comienza la alimentación exógena, ya que se presentan limitaciones morfológicas, como el desarrollo y tamaño de la boca y limitaciones fisiológicas como el desarrollo completo del intestino, páncreas, hígado y estómago, ya que mientras estos órganos no estén bien desarrollados y sean funcionales, pueden existir restricciones en el tipo de alimento que las larvas pueden utilizar (García-Gasca *et al.*, 2006, Galaviz *et al.*, 2011).

El presente estudio aporta una descripción comparativa a nivel histológico del desarrollo temprano de larvas de chame, desde la eclosión hasta el 6° dpe, enfocado al sistema digestivo y visual, destacando que no existe información publicada previamente al respecto. En primera instancia, los resultados presentados describen la morfología de la larva de chame durante la etapa endotrófica y el inicio a la fase endoexotrófica.

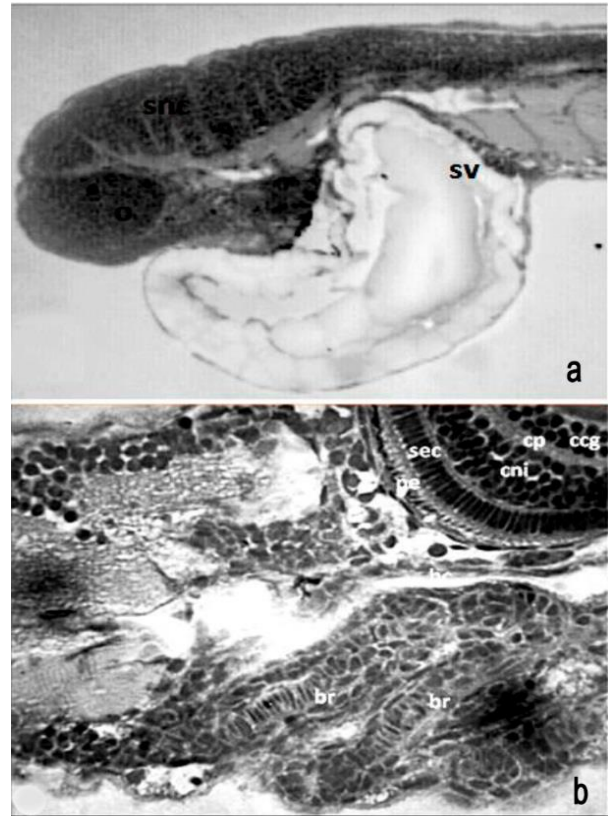


Figura 5. Cortes longitudinales de larvas de chame. a) 1 dpe, b) acercamiento del corte longitudinal de la cabeza de una larva 2 dpe (100x). bc: conducto bucofaríngeo, br: branquia, pe: capa de epitelio pigmentado, sec: segmentos externos, cni: capa nuclear interna, cp: capa plexiforme interna, cgg: capa de células ganglionares, cne: capa nuclear externa, sv: saco vitelino, snc: sistema nervioso central, o: ojo presuntivo. Tinción hematoxilina-eosina.

El chame es un pez sin estómago, por lo que dicha descripción contribuye al conocimiento del desarrollo temprano en peces agástricos. De acuerdo con Dabrowski (1982), se establecen tres categorías de peces considerando los principales eventos que ocurren durante la evolución y desarrollo de su sistema digestivo. En el primer grupo se incluye los peces que al inicio de la alimentación exógena presentan un estómago bien desarrollado y funcional. En el segundo grupo, se encuentra la mayoría de los peces marinos, en los cuales el estómago aparece después de iniciar la alimentación exógena (Lauff & Hoffer, 1984). En el tercer grupo, se incluye los peces que permanecen sin estómago a lo largo de toda su vida, siendo lo más común durante su desarrollo larvario el incremento de la longitud del intestino, por lo cual el chame entra en esta última categoría.

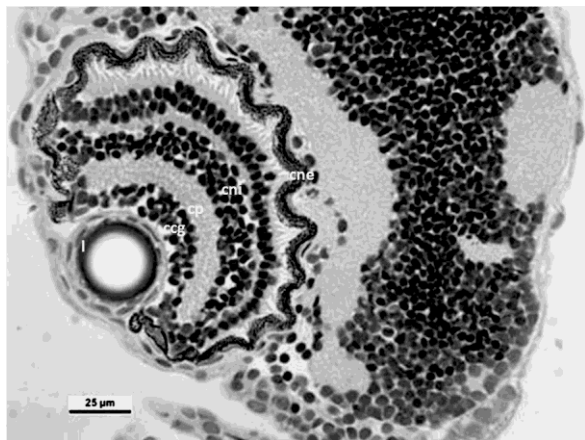


Figura 6. Larva de cinco días post-eclosión. ccg: capa de células ganglionares, cne: capa nuclear externa, cni: capa nuclear interna, cp: capa plexiforme interna, I: iris. Tinción hematoxilina-eosina.

Como dato inicial se destaca que las larvas de *D. latifrons* miden 1,0-1,3 mm al eclosionar (Rodríguez-Montes de Oca *et al.*, 2012), de forma similar a su equivalente ecológico en el Océano Atlántico, la naca *D. maculatus* (1 mm) (Flores-Coto & Zavala-García, 1982), lo cual da una idea del mínimo desarrollo de órganos y otras estructuras. Al momento de la eclosión, las larvas del chame no presentan boca ni ano abierto y tampoco se observaron ojos diferenciados. Además, presenta una gran masa de saco vitelino con una línea de células indiferenciadas que formarán el tubo digestivo, coincidiendo con otros peces como el bagre amarillo *Pelteobagrus fulvidraco* (Yang *et al.*, 2010), el halibut *Paralichthys californicus* (Gisbert *et al.*, 2004) y el dentón común *Dentex dentex* (Santamaría *et al.*, 2004) por mencionar algunos. Ante dichas comparaciones, el chame entra en la categoría de peces que tienen un desarrollo indirecto ya que proviene de huevos pequeños y transparentes, similar a algunos peces marinos, que de igual forma presentan larvas transparentes y que como características generales carecen de hemoglobina, tracto intestinal simple, esbozo del hígado, páncreas, vesícula biliar y vaso, riñones protonéfricos y otras estructuras de importancia durante su desarrollo, la pigmentación no es muy evidente y se puede observar la formación de paquetes celulares que darán forma al sistema visual.

Durante la absorción del saco vitelino muchas de las estructuras mencionadas arriba se diferencian y desarrollan su funcionalidad. La velocidad de estos eventos se debe a factores genéticos y ambientales (Falk-Petersen, 2005). Una diferencia entre el chame y otros peces, es que las reservas del saco vitelino son utilizadas en un corto periodo de tiempo, dado que ya no se observa al 3° dpe, donde a diferencia de otros

peces como la cabrilla *Paralabrax maculatofasciatus*, se ha reportado que existe una fase de alimentación combinada (Peña *et al.*, 2013).

Es importante considerar que para que un pez logre exitosamente la transición de alimentación endógena a exógena, debe tener estructuras funcionales asociadas a la alimentación (Yúfera & Darías, 2007). El hecho que el chame no presente un estómago en la fase de juvenil y adulto, da pauta a una de las principales diferencias funcionales de la actividad digestiva en sus larvas. En algunos peces marinos como el bagre amarillo al 3° dpe comienza gradualmente la función digestiva con mayor funcionalidad (Yang *et al.*, 2010). También existen otros peces, con un patrón de desarrollo muy similar al chame, donde los juveniles y adultos del pez pajarito *Hyporhamphus regularis ardelio*, presentan un tracto simple, casi libre de pliegues y sin un divertículo gástrico o estómago. Sin embargo, esta especie no puede ser usada como modelo del desarrollo ontogenético temprano del chame, dado que no se reportan publicaciones con un seguimiento histológico del desarrollo del pajarito desde etapas tempranas. Otros estudios de peces agástricos señalan que en el tiburón chino *Myxocyprinus asiaticus* las glándulas digestivas ya están presentes al 6° dpe y la alimentación exógena comienza al 7° dpe, los autores destacan que estos cambios estructurales están motivados por el consumo de rotíferos; lo cual no ha sido posible en el chame dado el tamaño de la abertura de la boca, de 90 μ . Así, las similitudes entre este pez y el chame son mínimas dado que en estos primeros 6 dpe, que coinciden con el periodo de alimentación combinada (endoexotrófica), en el tiburón chino se observan enterocitos, células pancreáticas con gránulos de zimógeno y ductos conectados a las glándulas accesorias del tracto digestivo (Liu *et al.*, 2013). Mientras que en el chame, la única coincidencia fue la presencia de células pancreáticas diferenciadas entre 5° y 6° dpe; además de la aparición de dientes mandibulares y papilas gustativas al 5° dpe de forma similar al dentón común; una vez que se registra la apertura de la boca y el ano, se observa un claro desarrollo de las estructuras asociadas al tracto digestivo (Santamaría *et al.*, 2004)

En el chame no se distinguieron glándulas gástricas hasta el 6° dpe, aun cuando en otros peces como la dorada (*Sparus aurata*) y la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*), dichas glándulas aparecen hasta el 32° dpe y 15° dpe respectivamente (Sarasquete *et al.*, 1997; Peña *et al.*, 2003). La ausencia de estas glándulas permite clasificar al chame como un pez agástrico; aunque se observó la proliferación de las células de moco o globet cells, como parte de la mucosa que recubre el esófago, se puede decir que para el chame es

más difícil la digestibilidad de los alimentos y tiene más gasto energético, debido a la ausencia de un estómago funcional y su comportamiento podría ser similar a lo mencionado por Takii *et al.* (1997) para el botete tigre *Takifugu rubripes*, botete *Sphoeroides testudineus* (Targett, 1975) y botete diana *S. annulatus* (García-Gasca *et al.*, 2006), ya que estos peces no poseen glándulas gástricas y la mayor parte de la digestión se efectúa en el intestino.

Otras diferencias sustanciales en el desarrollo temprano del chame, es el tiempo en que se consumen las reservas endógenas. En el chame no se observan remanentes del vitelo al 6° dpe; mientras que en larvas del dentón común se observan remanentes del saco vitelino hasta el 6° dpe y de la gota lipídica al día 9° dpe (Santamaría *et al.*, 2004). Sin embargo, al igual que en la breca *Pagellus erythrinus*, Micale *et al.* (2006), hasta el 5° dpe, las estructuras como boca y ano abierto con porciones claramente diferenciables tales como bucofaringe, esófago, estómago si va a estar presente y el intestino, incluyendo la presencia de páncreas, hígado y vejiga biliar y glándulas digestivas al 3° dpe, y para 5° dpe el arreglo celular del intestino anterior debe presentar vacuolas como señal de capacidad de transporte, al igual que ductos biliares y pancreáticos, y enrollamiento del intestino. Es importante señalar el hecho que prácticamente la mayoría de dichas estructuras y arreglos celulares estén presentes en el chame entre el 5°-6° dpe, indicaría presuntivamente que en esta etapa, el pez es apto para consumir alimento vivo, aun cuando no estén presentes las reservas endógenas.

Existen muchas otras diferencias evidentes del chame con otras especies, por ejemplo las larvas de la curvina blanca *Atractoscion nobilis* ya presentan un tracto digestivo medianamente diferenciado y evidencia de la presencia de glándulas digestivas funcionales al 3° dpe (Galaviz *et al.*, 2011) y en dorada *Sparus aurata*, es clara una etapa lecitoexotrófica o de alimentación combinada (Elbal *et al.*, 2004); aun cuando existen coincidencia en arreglos celulares en el intestino y en el mero leopardo *Plectropomus leopardus*, donde al 2° dpe la larva comienza a desarrollar la bucofaringe, esófago, estómago primario y partes del intestino; posteriormente se abre la boca, con un tamaño de 200-250 μ y además presenta una alimentación lecitoexotrófica (Qu *et al.*, 2012), mientras que en el chame esta estructura únicamente mide 90 μ en promedio (Rodríguez-Montes de Oca *et al.*, 2012). Por lo que además del desarrollo morfológico, una vez que sea posible ubicar presas suficientemente pequeñas para el inicio de la alimentación exógena en el chame, se ve la necesidad de continuar con este estudio enfocado a la actividad digestiva.

Una vez determinado el grado de desarrollo morfológico sería importante describir el patrón de producción y actividad enzimática durante esta primera etapa de transición del tipo de alimentación y el efecto combinado del manejo de las larvas, respecto a variables como temperatura y salinidad, además del tipo de dieta ofrecido (Govoni *et al.*, 1986), ya que el tipo de alimento vivo consumido o inerte es de alta relevancia, debido a que una presa o formulación en particular puede contribuir al proceso digestivo de una larva, considerando su posible contribución dada la presencia de enzimas digestivas. Este hecho podría mejorar significativamente la fisiología digestiva del chame, ya que en su conjunto, son parte de muchas características a determinar para establecer la factibilidad del cultivo de esta especie. En consecuencia, el presente trabajo sigue siendo una herramienta útil para lograr el cultivo larvario de un pez, pues indica que tan preparado o no, está un organismo para efectuar su transición a una alimentación exógena (Kolkovski, 2001).

Como segundo componente de este trabajo, se describe el desarrollo del sistema visual de las larvas de *D. latifrons*. Al eclosionar, el sistema visual de la mayoría de las larvas de peces teleósteos es indiferenciado y poco tiempo después se compone del cristalino y retina indiferenciada (Blaxter, 1975; Kawamura *et al.*, 1984). Estas características han sido señaladas en larvas del pargo (*Pagrus pagrus*) y pez cardenal (Tovar *et al.*, 2009). Esto coincide con lo observado en larvas de *D. latifrons*, ya que al momento de la eclosión no poseen un ojo estructurado; no obstante, se observan algunos elementos dentro de la estructura óptica, pero aún no están completos. Peña & Dumas (2007) comentan que ocurren cambios significativos en el desarrollo del sistema visual durante la etapa en que las larvas poseen el saco vitelino, esto, para asegurar una transición exitosa de la alimentación endógena a la exógena.

La cavidad óptica de *D. latifrons* que se observa el 2° dpe consiste solamente en una estructura precursora del ojo funcional, pero, se observa que la retina se encuentra estratificada. Este nivel de desarrollo coincide con el reportado para algunas especies de agua dulce, como el pez mariposa y pez boga (*Leporinus piau*), así como para las larvas de besugo. En dichas especies, a partir del 1° dpe se observa una estructura ocular semidesarrollada, e incluso pigmentación del ojo proveniente de los bordes de la retina (Borcatto *et al.*, 2004; Ibrahim *et al.*, 2006; Molina, 2011), con la única diferencia que en las larvas del besugo, las células fotorreceptoras están desarrolladas completamente al 2° dpe (Ibrahim *et al.*, 2006). Es importante mencionar que en *D. latifrons*, no obstante que a esta misma edad

el nivel de desarrollo es notable, aún no es posible distinguir una capa específica de los componentes oculares.

Asimismo, durante la etapa de absorción del saco vitelino (0-3 dpe) el ojo se ha diferenciado casi por completo y para el 4° dpe, se observa la córnea, cristalino, iris y retina, así como su epitelio pigmentado, evento considerado como una característica de un sistema visual funcional (Kawamura *et al.*, 1984). Los resultados obtenidos en el presente estudio, coinciden con lo señalado para larvas de besugo *Pagrus pagrus* pues al día 4° dpe, el patrón de pigmentación del ojo está completo y por lo tanto el sistema visual está completamente desarrollado (Roo *et al.*, 1999). Las larvas de *D. latifrons* muestran el epitelio pigmentado a partir del 4° dpe, estado en que está abierto el hocico abierto en la larva; lo que indica que puede iniciar su alimentación exógena y en los días posteriores, no se observaron cambios aparentes en la estructura ocular. Para algunas especies se ha reportado que durante el periodo de nutrición endógena, el ojo no crece en tamaño y que lo observado presenta características similares al desarrollo del epitelio de pigmentación del sistema ocular en larvas de *P. maculatofasciatus* (Peña & Dumas, 2007).

Un aspecto adicional a considerar, es que aun entre organismos de la misma familia, la velocidad con que ocurren los eventos relevantes del desarrollo ontogenético de las larvas de diferentes peces puede variar significativamente, pero hacer una descripción del grado de desarrollo ontogenético, permite establecer las capacidades presentes en términos de digestión en un determinado momento, establecer los requerimientos fisiológicos de una larva, siendo lo anterior la base de la justificación de este trabajo con larvas de chame; destacando que una vez que sea factible continuar con su desarrollo en condiciones de laboratorio, será posible completar una descripción más clara de la funcionalidad y requerimientos alimenticios para lograr el inicio de la alimentación exógena.

CONCLUSIONES

La información generada en este trabajo permite establecer similitudes y diferencias de las larvas de chame *D. latifrons* durante los primeros 6 dpe en comparación con larvas de peces, tanto de ambientes dulceacuícolas como marinos, que se cultivan a diferentes escalas. Aun cuando este organismo es de alta dificultad para desarrollar su cultivo larvario, dado que tanto en Ecuador como en México se ha intentado sin éxito hasta el momento. El grado de diferenciación celular, presencia de estructuras a nivel de tracto digestivo y sistema visual de las larvas de chame son

comparables a otros peces, en los que se ha logrado exitosamente la producción de crías, la posibilidad que el componente faltante para efectuar la transición a una alimentación exógena sea uno o varios tipos de presa como alimento vivo aún por identificar (de acuerdo al tamaño de la boca), donde sea factible que el grado de actividad enzimática presente en el momento de iniciar su consumo ya se realice satisfactoriamente la digestión y absorción de sus componentes. Definitivamente, el hecho que gran parte de la información necesaria sobre organogénesis, histomorfología y funcionalidad de las estructuras presentes hasta este punto aún requieran ser establecidas, los resultados presentados dan la pauta para continuar con la búsqueda de las condiciones requeridas para el larvicultivo, en particular a encontrar la presa ideal para la primera alimentación; la siguiente meta es establecer el grado de actividad enzimática durante este periodo de tiempo y poder en el corto plazo, lograr avances significativos encaminados a lograr el cultivo larvario de esta especie de interés para la acuicultura.

AGRADECIMIENTOS

Para la realización de esta investigación se contó con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) número de registro 368450 y de la investigación 09IND03UH- Induced spawning and larval rearing of the “chame” *Dormitator latifrons* in laboratory conditions del proyecto: Human health and aquaculture: health benefits through improving aquaculture sanitation and best management practices. Aquaculture and Fisheries Collaborative Research Support Program (Aquafish CRSP) United States Agency for International Development (USAID). Se agradece la colaboración de la Dra. Maria Celia Portella de la Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Brasil, por su apoyo para el procesamiento histológico de las muestras.

REFERENCIAS

- Blaxter, J.H.S. 1975. The eye of larval fish. In: M.A. Ali (ed.). Vision in fishes. New approaches in research. Plenum Press, New York, pp. 427-443.
- Bonifáz, N., M. Campos & R. Castelo. 1985. El chame, una nueva fuente de alimentación e ingresos. Fundación Ciencia, Quito, 173 pp.
- Borçato, F.L., N. Bazzoli & Y. Sato. 2004. Embryogenesis and larval ontogeny of the “piauí-gordura”, *Leporinus piau* (Fowler) (Pisces, Anostomidae) after induced spawning. Rev. Bras. Zool., 21: 117-122.
- Castro-Rivera, B., G. Aguilar & G.J.P. Hernández. 2005. Conversión alimenticia de engordas puras y mixtas de

- popoyote (*Dormitator latifrons*, Richardson) en estanques de cemento. *Rev. Aquat.*, 23: 45-52.
- Cousin, J.C.B., G. Baluet & F. Baudin-Laurencin. 1986. Altérations histologiques observées chez des larves de turbot (*Scophthalmus maximus L.*) en élevage intensif. *Aquaculture*, 52: 173-189.
- Dabrowski, K. 1982. Proteolytic enzyme activity decline in starving fish alevins and larvae. *Environ. Biol. Fish.*, 7: 73-76.
- Elbal, M.T., M.P. García-Hernández & B. Agulleiro. 2004. Development of the digestive tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata L.*). Light and electron microscopic studies. *Aquaculture*, 234: 215-238.
- Falk-Petersen, I.B. 2005. Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish. *Fish Shellfish Immunol.*, 19: 397-412.
- Flores-Coto, C. & F. Zavala-García. 1982. Descripción de huevos y larvas de *Dormitator maculatus* (Bloch) de la Laguna de Alvarado, Veracruz. (Pisces: Gobiidae). *An. Inst. Cienc. Mar Limnol. Univ. Nac. Autón. México*, 9: 127-140.
- Fuiman, L.E. & A.E. Magurran. 1994. Development of predator defenses in fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 4: 145-183.
- Galavíz, M.A., A. García-Gasca, M. Drawbridge, A.A. Álvarez-González & M.L. López. 2011. Ontogeny of the digestive tract and enzymatic activity in white sea bass, *Atractoscion nobilis*, larvae. *Aquaculture*, 318: 162-168.
- García-Gasca, A., M. Galaviz, J.N. Gutiérrez & A. García-Ortega. 2006. Development of the digestive tract, trypsin activity, and gene expression in eggs and larvae of the bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus*). *Aquaculture*, 256: 366-376.
- Gisbert, E., R.H. Piedrahita & D.E. Conklin. 2004. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture*, 232: 455-470.
- Govoni, J.J., G.W. Boenhlert & Y. Watanabe. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environ. Biol. Fish.*, 16: 59-77.
- Holt, J.G. 2011. Larval fish nutrition. Wiley-Blackwell, Ukraine, 435 pp.
- Ibrahim, F.S., J.R. Krishen, S.G. James & S.A.A. Issa. 2006. Morphological development of post hatch larval goldlined seabream *Rhabdosargus sarba* (Forsk., 1775). *Aquacult. Res.*, 37: 1156-1164.
- Kawamura, G., R. Tsuda, H. Kumai & S. Ohashi. 1984. The visual cell morphology of *Pagrus major* and its adaptive changes with shift from pelagic to benthic habitats. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 50: 1975-1980.
- Kolkovski, S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and applications to formulated diets. *Aquaculture*, 200: 181-201.
- Larumbe, E. 2002. Algunos aspectos biológicos de los popoyotes (*Dormitator latifrons*) en cautiverio. *Revista Panorama Acuicola*. 25 pp. [http://fis.com/panoramaacuicola/noticia%203.htm]. Revisado: 2 marzo 2014.
- Lauff, M. & R. Hoffer. 1984. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture*, 37: 335-346.
- Liu, C.X., Z. Luo, X.Y. Tan & S.Y. Gong. 2013. Ontogenetic development of the digestive system in agastric Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus*, larvae. *J. World Aquacult. Soc.*, 44: 350-362.
- Medina-Hernández, E.A. 2012. Evaluación de la utilización de alimento vivo o inerte en la supervivencia y crecimiento de larvas del puyequ *Dormitator latifrons*. Tesis de Maestría en Recursos Acuáticos, Universidad Autónoma de Sinaloa, Sinaloa, 44 pp.
- Micale, V., M. Garaffo, L. Genovese, M.T. Spedicato & U. Muglia. 2006. The ontogeny of the alimentary tract during larval development in common pandora *Pagellus erythrinus L.* *Aquaculture*, 251: 354-365.
- Molina, A.A. 2011. Larval development of *Hypsophrys nicaraguensis* (Pisces: Cichlidae) under laboratory conditions. *Rev. Biol. Trop.*, 59: 1679-1684.
- Moyano, F.J., M. Díaz, F.J. Alarcón & M.C. Sarasquete. 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.*, 15: 121-130.
- Navarro-Rodríguez, M.C., V.R. Flores & M.E.R. González. 2004. Distribution and abundance of *Dormitator latifrons* (Richardson) larvae (Pisces: Eleotridae) in the natural protected area "Estero el Salado" in Jalisco, Mexico. *Biol. Mar. Oceanogr.*, 39: 31-36.
- O'Connell, P.C. 1981. Development of organ system in the northern anchovy, *Engralius mordax*, and other teleosts. *Am. Zool.*, 21: 429-446.
- Peña, R. & S. Dumas. 2007. Desarrollo de la retina en larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae) bajo condiciones de cultivo. *Cienc. Mar.*, 33: 293-300.
- Peña, R., S. Dumas, M. Villalejo-Fuerte & J. Ortiz-Galindo. 2003. Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. *Aquaculture*, 219: 633-644.
- Peña, R., S. Dumas, M. Villalejo-Fuerte & J.L. Ortiz-Galindo. 2003. Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. *Aquaculture*, 219: 633-644.
- Qu, M., S. Ding, X. Xu, M. Shen, Y. You & Y. Su. 2012. Ontogenetic development of the digestive system and growth in coral trout (*Plectropomus leopardus*). *Aquaculture*, 334: 132-141.

- Reséndez, M. 1973. Estudio de los peces de la Laguna de Alvarado, Veracruz, México. *An. Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.*, 34: 183-281.
- Rivera, M.C. & M. Botero. 2009. Alimento vivo enriquecido con ácidos grasos para el desarrollo larvario de peces. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.*, 22: 607-618.
- Rodríguez-Montes de Oca, G.A., E.A. Medina-Hernández, J. Velázquez-Sandoval, V.V. López-López, J.C. Román-Reyes, K. Dabrowski & M.C. Haws. 2012. Producción de larvas de Chame (*Dormitator latifrons*, Pisces: Eleotridae) usando GnRH α and LHRH α . *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.*, 25: 422-429.
- Rodríguez-Montes de Oca, G., E.A. Medina, H.J. Velázquez, S.V. López, L.C. Román-Reyes, K. Dabrowski, E. Gaxiola & M.C. Haws. 2011. Use of gonadotropin releasing hormone analogs on the induced reproduction of chame *Dormitator latifrons*. In: L. Liping & K. Fitzimmons (eds.). *Better science, better fish, better life Proceedings of the Ninth International Symposium on Tilapia in Aquaculture*. 22-24 Abril, 2011; Beijing, China. Shanghai Ocean University, Shanghai, pp. 187-191.
- Roo, F.J., J. Socorro, M.S. Izquierdo, M.J. Caballero, C.M. Hernández-Cruz, A. Fernández & H. Fernández-Palacios. 1999. Development of red porgy *Pagrus pagrus* visual system in relation with changes in the digestive tract and larval feeding habits. *Aquaculture*, 179: 499-512.
- Sánchez-Amaya, M.I., J.B. Ortiz-Delgado, Á. García-López, S. Cárdenas & C. Sarasquete. 2007. Larval ontogeny of redbanded seabream (*Pagrus auriga*) Valenciennes, 1843 with special reference to the digestive system. A histological and histochemical approach. *Aquaculture*, 263: 259-279.
- Sandstrom, A. 1999. Visual ecology of fish: a review with special reference to percids. *Natl. Bd. Fish. Pub. Fiskeriverket Rapp.*, 2: 45-80.
- Santamaría, C.A., M. Marín de Mateo, R. Traveset, R. Sala, A. Grau, E. Pastor & S. Crespo. 2004. Larval organogenesis in common dentex (*Dentex dentex*) L. (Sparidae): histological and histochemical aspects. *Aquaculture*, 237: 207-228.
- Sarasquete, C., J. Muñoz-Cueto, J. Arellano, & M. González de Canales. 1997. Histología e histopatología durante el desarrollo larvario de peces de interés en Acuicultura. In: M.L. González de Canales, J.A. Muñoz-Cueto & C. Sarasquete (eds.). *Servicios de Publicaciones de la Universidad de Cádiz*, Cádiz, pp. 11-34.
- Takii, K., K. Konishi, M. Ukawa, M. Nakamura & H. Kumai. 1997. Influence of feeding rates on digestion and energy flow in tiger puffer and red sea bream. *Fish. Sci.*, 63: 355-350.
- Targett, T. 1975. Food resource partitioning between the puffer fishes *Sphoeroides testudineus* and *S. spengleri* from Biscayne Bay, Florida and other aspects of their biology. M.Sc. Thesis, University of Miami, Miami, 59 pp.
- Tovar, M.O., M.J. Obando, E. Gómez, M.L. Caldas & H. Hurtado. 2009. Histología y morfometría del ojo del pez dulceacuícola *Paracheirodon axelrodi* (Characiformes: Characidae). *Rev. Biol. Trop.*, 57: 1107-1118.
- Ueberschär, B. 1988. Determination of the nutritional condition of individual marine fish larvae by analyzing their proteolytic enzyme activities with a highly sensitive fluorescence technique. *Meeresforsch. Rep. Mar. Res.*, 32: 144-154.
- Vázquez, R., S. González, A. Rodríguez & G. Mourente. 1994. Biochemical composition and fatty acid content of fertilized eggs, yolk sac stage larvae and first feeding larvae of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 119: 273-286.
- Yang, R., C.X. Xie, Q. Fan, C. Gao & L. Fang. 2010. Ontogeny of the digestive tract in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* larvae. *Aquaculture*, 302: 112-123.
- Yúfera, M. & M.J. Darías. 2007. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Aquaculture*, 268: 53-63.
- Zambonino-Infante, J.L. & C.L. Cahu. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp. Biochem. Physiol. Part C, Toxicol. Pharmacol.*, 130: 477-487.

Received: 1 June 2014; Accepted: 8 January 2015