



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL



CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

DEPARTAMENTO DE DESARROLLO DE TECNOLOGIAS

**HISTOLOGIA E HISTOQUIMICA DEL DESARROLLO
ONTOGENETICO DEL TUBO DIGESTIVO DE LARVAS DE
LA CABRILLA ARENERA (*Paralabrax maculatofasciatus*)
(PERCOIDEI: SERRANIDAE).**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS
MARINOS**

PRESENTA:

BIOL. MAR. RENATO PEÑA MARTINEZ

SEPTIEMBRE 2000

LA PAZ, B.C.S.

CONTENIDO

	Página
Lista de Figuras	i
Lista de Tablas	iii
Glosario	iv
Resumen	vii
Abstract	viii
I Introducción	1
Justificación	4
Antecedentes	6
Histología y anatomía del tubo digestivo	10
Cuadro general	10
Estructura histológica	10
Estructura anatómica	14
Bucofaringe	14
Esófago	15
Estómago	15
Intestinos	15
Objetivo General	17
Objetivos Particulares	17
II Material y Métodos	18
Obtención y mantenimiento de las larvas	18
Obtención de muestras	19
Desarrollo del tracto digestivo	19
Histoquímica del tracto digestivo	20
Carbohidratos	20
Proteínas	21
Lípidos	21
Descripción de resultados	21
Análisis estadístico	22
III Resultados	23
Desarrollo ontogenético del tubo digestivo	23
Desarrollo morfológico del tubo digestivo	23
Desarrollo histológico del tubo digestivo	28
Bucofaringe	28
Esófago	35

Estómago	40
Intestinos	46
Especializaciones del tubo digestivo	56
Vejiga gaseosa	56
Organos anexos	56
Hígado	56
Páncreas	57
Desarrollo específico de órganos	59
Histoquímica del desarrollo del tubo digestivo	61
Carbohidratos	61
Proteínas	67
Lípidos	69
IV Discusión	72
V Conclusiones	87
VI Recomendaciones	89
VII Referencias	91
Anexo 1	109
Anexo 2	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Configuraciones del tubo digestivo en peces con diferentes hábitos alimentarios.

Figura 2.- Plano general de estructura histológica del tubo digestivo.

Figura 3.- Formas básicas y papel de la túnica mucosa a lo largo del tubo digestivo.

Figura 4.- Crecimiento de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*.

Figura 5.- Eleuteroembrión de 1 día. 5x.

Figura 6.- Eleuteroembrión de 2 días. 5x.

Figura 7.- Larva de 3 días. 5x.

Figura 8.- Larva de 5 días. 5x.

Figura 9.- Larva de 16 días. 5x.

Figura 10.- Larva de 3 días. 40x.

Figura 11.- Larva de 4 días. 10x.

Figura 12.- Larva de 5 días. 10x.

Figura 13.- Larva de 6 días. 40x.

Figura 14.- Larva de 9 días. 10x.

Figura 15.- Larva de 10 días. 10x.

Figura 16.- Larva de 10 días. 40x.

Figura 17.- Larva de 16 días. 10x.

Figura 18.- Larva de 22 días. 10x.

Figura 19.- Larva de 22 días. 40x.

Figura 20.- Larva de 5 días. A) 10x; B) 40x.

Figura 21.- Larva de 5 días. 40x.

Figura 22.- Larva de 6 días. 10x.

Figura 23.- Larva de 22 días. 10x.

Figura 24.- Larva de 22 días. 40x.

Figura 25.- Larva de de 3 días. 10x.

Figura 26.- Larva de 5 días. 40x.

Figura 27.- Larva de 9 días. 10x.

Figura 28.- Larva de 9 días. 3.2x.

Figura 29.- Larva de 16 días. A) 10x; B) 40x.

Figura 30.- Larva de 22 días. 10x.

Figura 31.- Eleuteroembrión al momento de la eclosión. A) 10x; B) 40x.

Figura 32.- Larva de 1 día. 10x.

Figura 33.- Larva de 2 días. 40x.

Figura 34.- Larva de 2 días. A) 40x; B) 40x.

Figura 35.- Larva de 4 días. A) 10x. B) 40x.

Figura 36.- Larva de 10 días. 40x.

Figura 37.- Larva de 6 días. 10x.

Figura 38.- Larva de 9 días. 10x.

Figura 39.- Larva de 22 días. A) 40x; B) 100x.

Figura 40.- Larva de 2 días. 40x.

Figura 41.- Larva de 12 días. 40x.

Figura 42.- Larva de 5 días. 10x.

Figura 43.- Larva de 4 días. A) 10x; B) 100x.

Figura 44.- Larva de 12 días. 40x.

Figura 45.- Larva de 5 días. 40x.

Figura 46.- Larva de 22 días. 10x.

Figura 47.- Larva de 22 días. 40x.

Figura 48.- Larva de 6 días. 10x.

Figura 49.- Larva de 16 días. 10x.

Figura 50.- Larva de 6 días. 10x.

Figura 51.- Larva de 16 días. 40x.

Figura 52.- Calendario de alimentación propuesto para el cultivo larval de *Paralabrax maculatofasciatus*.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.- Desarrollo de los componentes del tubo digestivo de *Paralabrax maculatofasciatus*.

Tabla 2.- Absorción de carbohidratos, lípidos y proteínas por el tubo digestivo de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*.

GLOSARIO

Borde plumoso.- Proyección de la superficie apical de los enterocitos en ambos intestinos que consiste en numerosas microvellosidades, cada una está cubierta por una extensión de la membrana plasmática. Recibe diferentes nombres: limbo estriado (Eliséiev *et al.*, 1983), borde estriado (Maximow y Bloom, 1957; Leeson *et al.*, 1990; Wheater *et al.*, 1985).

Cardias.- Región anterior del estómago, comunicada con el esófago por un esfínter esofágico (Maximow y Bloom, 1957; Leeson *et al.*, 1990; Pirlot, 1976; Yasutake y Wales, 1983).

Células caliciformes.- Consideradas glándulas unicelulares, son células secretoras de mucosubstancias. Se presentan a lo largo del tubo digestivo, excepto en el estómago, intercaladas entre las células epiteliales de la mucosa (Maximow y Bloom, 1957; Leeson *et al.*, 1990; Eliséiev *et al.*, 1983).

Dientes heterodontos.- Serie dentaria cuya morfología no es uniforme, lo cual le confiere alto grado de especialización (Pirlot, 1976).

Dientes homodontos.- Serie dentaria con morfología uniforme (Pirlot, 1976).

Eleuteroembrión.- De acuerdo a Balon (1984), fase del periodo embrionario de los peces que comienza desde el momento de la eclosión hasta que son absorbidos completamente el saco vitelino y el glóbulo de aceite.

Enterocitos.- Término que reciben las células epiteliales de la mucosa que reviste a ambos intestinos del tubo digestivo debido a su función de absorción de nutrientes (Stroband y Dabrowski, 1979).

Epitelio cilíndrico.- Tipo de epitelio caracterizado por una sola hilera de células que presentan una altura superior a la anchura de su base. El núcleo se encuentra alineado en la base de las células (Maximow y Bloom, 1957; Leeson *et al.*, 1990; Eliséiev *et al.*, 1983).

Epitelio cúbico.- Tipo de epitelio caracterizado por una sola hilera de células que presentan una altura similar a la anchura de su base. El núcleo es redondo y se encuentra a la mitad de la célula (Maximow y Bloom, 1957; Leeson *et al.*, 1990; Eliséiev *et al.*, 1983).

Epitelio de transición.- Tipo de epitelio que se caracteriza por la forma plana de las células cuando está distendido y por la forma cúbica cuando está en reposo. En mamíferos se encuentra revistiendo al sistema excretor (Maximow y Bloom, 1957; Leeson *et al.*, 1990; Eliséiev *et al.*, 1983).

Epitelio plano estratificado.- Concepto que se aplica para diferenciar al tipo de epitelio en el cual las células componentes son planas con núcleos aplanados y largos. El término estratificado se refiere a la presencia de numerosas capas de células epiteliales planas (Leeson *et al.*, 1990).

Fondo.- Región media del estómago, se ubica detrás del cardias, algunos autores se refieren a él como cuerpo (Pirlot, 1976; Romer y Parsons, 1981).

Papilas filiformes.- Papilas gustativas observadas en la lengua, se caracterizan por ser delgadas y de forma cónica (Leeson *et al.*, 1990).

Papilas fungiformes.- Papilas gustativas presentes en la lengua cuya silueta es similar a la de un hongo (Leeson *et al.*, 1990).

Pinocitosis.- Proceso de absorción celular. Consiste en el envolvimiento de partículas por parte de la superficie apical del enterocito, a través del borde

plumoso. Se asocia principalmente con la absorción de proteínas (de Robertis *et al.*, 1977; Watanabe, 1984a) y el sistema inmunológico (Stroband y Dabrowski, 1979).

Tejido.- Conjunto de células con las mismas características estructurales que realizan una función en conjunto (Leeson *et al.*, 1990).

Vacuola digestiva.- Nombre que recibe un lisosoma secundario. Se forma por la acumulación de material absorbido por la célula. Presenta su propia membrana (de Robertis *et al.*, 1977).

Vesícula.- Estructura celular formada como resultado del proceso de pinocitosis. Presenta parte de la membrana celular (de Robertis *et al.*, 1977).

Zimógeno.- Precursor inactivo de enzimas digestivas que se forma y acumula en los acinos pancreáticos en forma de gránulos y que posteriormente son secretados y transportados hacia los intestinos (Leeson *et al.*, 1990).

RESUMEN

Se utilizaron métodos histológicos e histoquímicos para describir el desarrollo ontogenético del tubo digestivo en larvas de *Paralabrax maculatofasciatus* obtenidas bajo condiciones de cultivo. Las larvas se mantuvieron en tanques de 140 l de volumen por 30 días a 25.2 ± 0.2 °C de temperatura. El calendario de alimentación consistió del rotífero *Brachionus plicatilis* desde el día 2 después de la eclosión hasta el día 13, nauplios de *Artemia*, enriquecidos, del día 12 al día 17, juveniles de *Artemia* del día 14 al día 26, y una dieta artificial semihúmeda desde el día 20 después de la eclosión en adelante. Cuarenta larvas fueron recolectadas diariamente desde la eclosión hasta el día 14, y posteriormente cada dos días hasta el día 30. Se anestesiaron con metil sulfonato de tricaina (MS-222) (35 mg/l) y se registró su longitud total en milímetros. Se fijaron con formol al 10% y se incluyeron con la técnica de doble inclusión alginato-parafina. Se realizaron cortes de 7 μ m de espesor y se tiñeron con hematoxilina y eosina, ácido peryódico de Schiff o ninhidrina-Schiff. El desarrollo del tubo digestivo en larvas de *P. maculatofasciatus* sigue un patrón básico. Al momento de la eclosión, el tubo digestivo es un tubo recto indiferenciado. Durante los primeros dos días, las larvas tuvieron una nutrición endógena. Al principio del día 2, la boca y ano se abrieron, indicando el comienzo de una nutrición endógena y exógena. En el día 3, el saco vitelino se reabsorbe completamente e inicia la diferenciación del estómago en la región media del tubo digestivo. A partir de este día, la fuente nutritiva es exógena. En el día 5, el tubo digestivo se diferenció en bucofaringe, esófago, estómago, intestino anterior, intestino posterior, y recto. Dos días después del inicio de la primera alimentación, se observó la absorción de carbohidratos por el borde plumoso de los enterocitos de ambos intestinos. El hígado mostró una acumulación de glucógeno durante todo el período experimental. La formación de vesículas ninhidrina-Schiff positivas se observó en los enterocitos del intestino posterior. Los enterocitos en el intestino anterior mostraron la formación de numerosas vacuolas gástricas. Tanto las vesículas como las vacuolas aumentaron en tamaño y número junto con el desarrollo. Las glándulas gástricas y ciegos pilóricos aparecieron en el día 16. Las vesículas del intestino posterior y las vacuolas del intestino posterior disminuyeron gradualmente en tamaño y número, justo después de la aparición de las glándulas gástricas. Se propone realizar una modificación en el calendario de alimentación de larvas de *P. maculatofasciatus*.

ABSTRACT

Histological and histochemical methods were used to describe the development of the digestive tract in *P. maculatofasciatus* larvae reared under controlled conditions. The larvae were kept in a 0.1 m³ tank for 30 days at a temperature of 25.2 ± 0.2°C. The feeding schedule was *Brachionus plicatilis* from day 2 after hatching to day 13, enriched *Artemia* nauplii from day 12 to day 17, *Artemia* juveniles from day 14 to day 26, and a semimoist artificial diet from day 20 and onwards. Forty larvae were sampled daily from hatching until day 14 and then every two days until day 30. They were anesthetized with tricaine methane sulfonate (MS-222) (35 mg/L), total length measured, fixed with 10% formaldehyde and double-embedded in an alginate-paraffin matrix. They were stained with haematoxylin-eosin, or periodic acid Schiff or ninhydrine-Schiff reagents. Development of the digestive tract in *P. maculatofasciatus* larvae followed a basic pattern. At hatching, it consisted of an undifferentiated straight tube laying over the yolk sac. During the first two days, eleutheroembryo had an endogenous-type of nutrition. On day 2, at first feeding, the yolk-sac has decreased in size. The mouth and anus opened, indicating the onset of an endogenous-exogenous nutrition. On day 3, the yolk-sac was depleted and differentiation of the stomach in the midgut began. On day 5, the digestive tract was differentiated into buccopharynx, esophagus, stomach, anterior intestine, posterior intestine, and rectum. A few days after the onset of first feeding, carbohydrates were absorbed in both intestines through the enterocyte brush border. The liver showed an accumulation of glycogen during the whole experimental period. Formation of several apical ninhydrine-Schiff positive vesicles were observed in the enterocyte of the posterior intestine. The enterocytes in the anterior intestine showed the formation of large vacuoles. Both vesicles and vacuoles increased in size and number along with the development. The gastric glands and pyloric caeca appeared on day 16. Vesicles of the posterior intestine and vacuoles of the anterior intestine decreased gradually right after the appearance of gastric glands. A modification of the feeding schedule of *P. maculatofasciatus* larvae is proposed.



INTRODUCCION

A pesar de que en los últimos años se ha consolidado como una alternativa con amplio potencial de desarrollo y con grandes expectativas económicas, la acuicultura de peces marinos dista mucho de convertirse en la panacea de los problemas alimenticios de los países en vías de desarrollo (Bardach *et al.*, 1986; Rana, 1997), tan solo en 1996, a escala mundial, el cultivo de peces marinos representó el 3.8 % de un total de 16,664,491 toneladas métricas (tm); mientras que el cultivo de peces dulceacuícolas fue del 86.2 %, y el 10 % restante correspondió a la producción del cultivo de peces diádromos (Tucker, 1998).

En México durante el mismo año, según la Organización de Alimento y Agricultura de las Naciones Unidas (FAO), la producción para el cultivo de peces dulceacuícolas fue del orden de 22,358 tm, por su parte, el cultivo de peces diádromos alcanzó una producción de 2,706 tm, mientras que la producción para el cultivo de peces marinos fue nula (Tucker, 1998). Esto obedece a la ocurrencia de varios factores tanto tecnológicos, como económicos y sociales: el desconocimiento de la biología de las especies que permita la implementación de nuevas y mejores tecnologías que faciliten desarrollar las actividades de cultivo de manera sustentable; la carencia de una cultura de consumo de productos marinos que no sean moluscos y/o crustáceos; una pobre infraestructura e inclusive un apoyo federal limitado (Rana, 1997).

Es por ello que en México, la acuicultura de peces marinos se encuentra en una etapa de investigación en el ámbito de ciencia básica, con la convicción de contribuir al

conocimiento de la biología de las especies, que posteriormente podrá integrarse en la planeación de centros de producción acuícola a escala comercial.

Ahora, si bien es cierto que actualmente dicha actividad presenta una de sus principales dificultades durante las etapas del cultivo de las fases iniciales del ciclo de vida de los organismos, es indudable que el éxito de la piscicultura, tanto como unidad de producción o como ámbito de investigación, presenta gran importancia dentro de los planes de desarrollo de nuestro país. Actualmente, varias instituciones se han interesado en investigar y proponer el desarrollo de sistemas y tecnologías de cultivo aplicables a las especies locales de importancia comercial.

Una de tales especies es la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1868), la cual presenta ciertas ventajas biológicas para su cultivo, como tener una reproducción que ocurre de manera espontánea en condiciones de cultivo, permitiendo la obtención de huevos y larvas para la producción de juveniles casi todo el año (Matus-Nivón *et al.*, 1990; Avilés-Quevedo *et al.*, 1995; Rosales-Velázquez, 1997). Actualmente, dicha especie se cultiva hasta la etapa de engorda en el laboratorio de Biología Experimental del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional (CICIMAR-IPN) en La Paz, Baja California Sur.

El éxito del cultivo de una especie depende en gran medida de su óptimo desarrollo en condiciones controladas durante todos o varios periodos de su ciclo de vida (Matus-Nivón *et al.*, 1990). Un periodo de particular importancia es el periodo larval, el cual, es característico de las especies que presentan una ontogenia indirecta y que está ausente en las especies con ontogenia directa (Balon, 1975; 1984). En el periodo larval, las larvas atraviesan por una serie de transformaciones tanto morfológicas como fisiológicas (Reinecke *et al.*, 1997) necesarias para su desarrollo a juveniles, que las hacen susceptibles a una gran cantidad de factores, por lo que se considera como un “periodo crítico” durante el desarrollo de tecnologías para el cultivo de peces marinos (Tanaka, 1973; Bardach, *et al.*, 1986; Sorgeloos *et al.*, 1991; Bengtson, 1993; Tucker, 1998).

Entre los principales factores que influyen directamente en el desarrollo de las larvas se encuentra la etapa de la primera alimentación, en la cual, la larva cambia de una alimentación endógena a una exógena, una vez que se han agotado sus reservas vitelinas (Lagler *et al.*, 1984; Balon, 1986; Blaxter, 1988; Bisbal y Bengtson, 1995; Segner *et al.*, 1993; Sarasquete *et al.*, 1995; Calzada, 1996; Calzada *et al.*, 1998; Tucker, 1998). Para poder sobrellevar los efectos de este cambio, las larvas requieren de un mínimo de estructuras anatómicas y digestivas que permitan la obtención, digestión y absorción del nuevo alimento (Segner *et al.*, 1993; Calzada *et al.*, 1998). El desarrollo del tracto digestivo se lleva a cabo con el crecimiento de la larva, ya que generalmente, desde el momento de la eclosión, el tracto digestivo está menos desarrollado que en los juveniles y adultos (Blaxter, 1969; Tanaka, 1973; Kapoor *et al.*, 1975; Dabrowski, 1984; Govoni *et al.*, 1986; Blaxter, 1988; Verreth *et al.*, 1991, 1992; Bisbal y Bengtson, 1995; Sarasquete *et al.*, 1995; Calzada, 1996; Segner, 1996).

JUSTIFICACION

La investigación referente al desarrollo de la fisiología digestiva de las larvas de peces, constituye un primer paso dentro del desarrollo de nuevas tecnologías para el cultivo de cualquier especie, ya que permite:

- 1) Delimitar la longitud del período larval en función del estado de desarrollo del tubo digestivo de las larvas (Bisbal y Bengtson, 1995), ya que éste se encuentra tanto histológicamente, morfológicamente y fisiológicamente menos desarrollado que en juveniles y adultos, lo que significa que las larvas presentan una capacidad digestiva diferente (Segner, 1996).
- 2) Una vez delimitado y caracterizado el periodo larval en términos del desarrollo del tubo digestivo es posible entender los requerimientos alimenticios de la larva tanto cualitativamente como cuantitativamente (Tanaka, 1973; Dabrowski, 1991; Verreth *et al.*, 1992; Sorgeloos, 1994), ya que dichos requerimientos suelen ser diferentes durante el periodo larval, sin importar los hábitos alimentarios de los juveniles y adultos (Segner, 1996).
- 3) Como consecuencia, es factible programar un calendario de alimentación basado en el conocimiento de la capacidad digestiva de las larvas, de tal forma que se consiga el mayor aprovechamiento del alimento por parte de las mismas, con lo que podría ser posible disminuir las elevadas tasas de mortalidad reportadas durante el cultivo larval (Tanaka, 1971; Fyhn, 1989), lo cual se verá reflejado en mayores tasas de crecimiento y supervivencia (Holt, 1993).
- 4) De igual manera, sería posible inferir el momento y el mecanismo óptimos para iniciar el destete temprano de las larvas (Rösch y Segner, 1990; Bengtson, 1993; Holt, 1993; Person Le Ruyet *et al.*, 1993; Sorgeloos, 1994).

- 5) Por otro lado, mediante análisis histológicos se puede evaluar la calidad de la dieta. Además del incremento en peso y longitud, las alteraciones estructurales en el tubo digestivo e hígado brindan información sobre la calidad del alimento, la metabolización de la dieta y el estado nutricional de la larva (Segner *et al.*, 1988; Dabrowski *et al.*, 1989; Rösch y Segner, 1990).
- 6) Finalmente, al ofrecer una dieta artificial cuanto antes, es posible lograr una reducción en los costos de producción y mantenimiento del alimento vivo, que se produce de manera simultánea al cultivo larval (Holt, 1993; Person Le Ruyet *et al.*, 1993; Sorgeloos, 1994), ya que en muchas ocasiones no es posible alcanzar una producción constante debido a fluctuaciones en las condiciones naturales y a los altos requerimientos en términos de infraestructura, equipo y mantenimiento (Kissil, 1984; Kanazawa, 1985; Kanazawa, 1998).

Es evidente la necesidad de incrementar el desarrollo de trabajos de investigación enfocados al estudio de la fisiología digestiva de las larvas de peces (Tanaka, 1973). Estos deben realizarse desde dos perspectivas diferentes: primero, son necesarios los estudios sobre los cambios estructurales durante el desarrollo del tracto digestivo, lo cual permite establecer las bases físicas de la digestión. Segundo, es importante conocer los mecanismos de los procesos de digestión, absorción y asimilación de proteínas, carbohidratos y lípidos provenientes del alimento, ya que funcionan como fuentes de energía durante el crecimiento (Watanabe, 1988). Además, son incorporados de manera diferente en los juveniles y adultos (Watanabe, 1984a; Segner *et al.*, 1993; Walford y Lam, 1993). Por otro lado, se debe estudiar el desarrollo de la capacidad digestiva propiamente dicha, lo cual incluye el desarrollo de la actividad enzimática en el tubo digestivo (Alarcón-López y Martínez-Díaz, 1998).

ANTECEDENTES

Paralabrax maculatofasciatus pertenece a la familia Serranidae, suborden Percoidei del orden Perciformes. Dicha familia cuenta con un total de 449 especies distribuidas en 62 géneros y tres subfamilias (Nelson, 1994).

P. maculatofasciatus se distribuye desde Monterey, California hasta Guerrero, México, incluyendo el Golfo de California (Miller y Lea, 1972). Habita principalmente en bahías y zonas costeras sobre fondos arenosos cercanos a rocas. Sus hábitos alimenticios son diurnos y su dieta consiste principalmente de peces pequeños y crustáceos bentónicos (Heemstra, 1995).

Esta especie ha sido objeto de variados estudios de investigación. Butler *et al.* (1982) describieron el desarrollo inicial de tres especies de *Paralabrax* en las costas de California, incluyendo la especie en cuestión, con el objeto de facilitar la identificación de las especies durante el periodo larval. Hastings (1989) describió el desarrollo del hermafroditismo protogínico presente en esta especie. Matus-Nivón *et al.* (1990), manifestaron el potencial de cultivo de la cabrilla arenera con base a factores como: el crecimiento al primer y segundo mes después de la eclosión, supervivencia, conducta, resistencia a la manipulación, naturaleza del desove y cantidad de esfuerzo para realizar el cultivo. A partir de entonces, se han desarrollado trabajos que abarcan diferentes aspectos de su cultivo. Se han establecido los efectos de la alimentación sobre los desoves de los reproductores en cautiverio (Rosales-Velázquez, 1997). Se ha optimizado el proceso de producción de semilla (Alvarez-González, 1999). También se han registrado los efectos de condiciones de estrés crónico sobre la microanatomía del estómago, corazón, riñón e hígado de adultos en condiciones de cultivo (Zacarías-Soto, 1997). Inclusive, se han editado un par de manuales para el cultivo y comercialización de la especie (Sepesca, 1994; Avilés-Quevedo *et al.*, 1995).

Sin embargo, hasta el momento no se han desarrollado estudios enfocados a disminuir la elevada mortalidad reportada durante el cultivo larval de *Paralabrax*

maculatofasciatus, no obstante, ha sido posible reducirla del 95% (Avilés-Quevedo *et al.*, 1995) al 89% (Alvarez-González, 1999).

El desarrollo del tracto digestivo en peces, así como el inicio de su actividad fisiológica, han sido ampliamente estudiados en muchas otras especies, tanto en larvas, juveniles o adultos, ya sean marinos o dulceacuícolas.

Tanaka (1969) clasificó a las larvas de peces en dos grandes grupos, basados en el grado de desarrollo del tubo digestivo al momento de la eclosión. En el primer grupo, los huevos son bentónicos y telolécitos por lo que al momento de la eclosión, el tubo digestivo se encuentra bien formado. Por otro lado, en el segundo grupo, los huevos son pelágicos y oligolécitos y al momento de la eclosión aún no se ha diferenciado el tubo digestivo en los eleuteroembriones.

Iwai (1967), observó en *Plecoglossus altivelis* la presencia de dos tipos celulares en ambos intestinos, de larvas de un día de edad, unas presentaban cilios y otras presentaban microvellosidades. Las primeras las relacionó con el transporte de alimento y movilización de heces, mientras que las células con microvellosidades fueron sugeridas como las responsables de la absorción. En un trabajo posterior, Iwai y Tanaka (1968) observaron en *Hemiramphus sajori* la presencia de numerosos gránulos acidófilos en los enterocitos del intestino posterior, a los cuales denominaron células granulares, relacionándolas directamente con la absorción de proteínas por medio de pinocitosis. Por otro lado, en el intestino anterior observaron numerosas células que presentaban vacuolas supranucleares, proponiendo que estaban involucradas en la absorción de lípidos.

En trabajos posteriores, Tanaka (1971, 1972a, 1972b, 1973) describió el desarrollo del tubo digestivo, así como el inicio de la absorción de proteínas y lípidos en cerca de 20 especies, tanto dulceacuícolas, como marinas, en todas ellas la absorción de proteínas estaba caracterizada por la presencia de vesículas en el área apical de los enterocitos del intestino posterior, mientras que la absorción de lípidos se evidenciaba

por la presencia de vacuolas en la región supranuclear de los enterocitos del intestino anterior. Observó que en todas las especies estudiadas, el desarrollo del tubo digestivo presenta ciertas características morfológicas que generalizó en un patrón básico de desarrollo, el cual, comprende diferentes etapas: En una etapa inicial, al momento de la primera alimentación se observa que ambas mandíbulas, arcos branquiales y aberturas branquiales están formadas. Se han desarrollado pliegues en la mucosa. Los intestinos se diferencian por la presencia de una válvula intestinal. El epitelio de ambos intestinos está compuesto por células cilíndricas con un borde estriado bien desarrollado. El ano está abierto. El hígado está bien desarrollado y ubicado en la región anterior del cuerpo. El páncreas sintetiza gránulos de zimógeno y presenta tejido exócrino y acinos endógenos. La vesícula biliar se encuentra entre el hígado y el intestino anterior. Posteriormente, en una segunda etapa, adquieren la forma digestiva del adulto justo antes de iniciar el periodo juvenil, de este modo, se forman los dientes mandibulares. Aparecen las papilas gustativas. Se forman los dientes faríngeos. El estómago cambia en forma y aparecen los acinos gástricos. Los ciegos pilóricos comienzan a formarse. El tubo digestivo se enrolla. Aparecen células caliciformes en ambos intestinos. Se forma el hepatopáncreas.

Tanaka *et al.* (1972), Stroband (1977), Watanabe y Sawada (1985), Kjørsvik *et al.* (1991), Verreth *et al.* (1992), Gawlicka *et al.* (1995) al trabajar con diferentes especies, mencionan que al momento de la eclosión el tubo digestivo es un tubo recto indiferenciado y que durante el desarrollo ocurre una diferenciación tanto estructural como funcional. En este sentido, Watanabe (1981) describió las características supranucleares de las células epiteliales de los intestinos anteromedio y posterior en larvas y juveniles de *Oncorhynchus masou*, *Hypomesus olidus*, *Cottus nozawae*, *Tilapia nilotica* y *Carassius auratus*. Encontró que en todas las especies, la región supranuclear de los enterocitos del intestino anterior se tiñó profundamente con hematoxilina; mientras que en el intestino posterior, la región supranuclear de los enterocitos de las primeras dos especies presentaron características cromofóbicas, y en las otras tres especies presentaron vacuolas. Posteriormente, el mismo autor utilizó peroxidasa de rábano como marcador y demostró el papel que juegan las células del intestino

posterior en la absorción de proteínas intactas al observar una reacción positiva a la peroxidasa en todas las especies. Recientemente, Calzada *et al.* (1998) utilizaron técnicas de microscopía electrónica y encontraron que existe una diferenciación inicial entre los intestinos de las larvas de *Sparus aurata* desde el momento de la eclosión.

Se han realizado numerosos trabajos en los que se describe el desarrollo del tubo digestivo en larvas que cuando son juveniles y adultos presentan diferentes hábitos alimentarios (Grizzle y Curd, 1978; Buddington y Doroshov, 1986; Ferraris *et al.*, 1987; Loewe y Eckmann, 1988; Boulhic y Gabaudan, 1992; Bisbal y Bengtson, 1995; Sarasquete *et al.*, 1993a; 1995; Segner y Rösch, 1998; Aguilera-González; 1999; Gisbert *et al.*, 1999; Lazo, 1999). A pesar de esta diferencia en hábitos alimentarios cuando adultos, las larvas de las especies presentan las mismas estructuras del tubo digestivo, así como los mismos mecanismos de absorción de nutrientes. Stroband (1977), Govoni *et al.* (1986), Horn (1989), Sale (1991), Clements y Choat (1993), Tucker (1998) señalan que la mayoría de las especies herbívoras presentan larvas carnívoras. Esto sugiere que la diferenciación y especialización del tubo digestivo entre carnívoros y herbívoros ocurre al momento de transformarse en juveniles (Tanaka, 1973; Stroband, 1977). Más aún, en todas ellas se pone de manifiesto, de alguna manera u otra, el patrón básico de desarrollo del tubo digestivo propuesto por Tanaka (1973), sin embargo, este patrón de desarrollo difiere interespecíficamente en el sentido de que la aparición y diferenciación de los elementos del tubo digestivo varían, debido a elementos específicos que involucran factores tanto ecológicos, físicos e inclusive filogenéticos (Tanaka, 1973). De esta forma, unas estructuras tan importantes como las glándulas gástricas están formadas a los 20 días en *Pagrus major* (Tanaka, 1971), a los 31 días en *Paralichthys dentatus* (Bisbal y Bengtson, 1995), ó a los 120 días después de la eclosión en *Plecoglossus altivelis* (Tanaka, 1971).

La determinación del momento en el que el tubo digestivo puede absorber exitosamente el alimento suministrado, ya sea en, constituye uno de los principales objetivos de todos estos estudios. Se ha encontrado que ese momento se caracteriza por la formación de las glándulas gástricas y ciegos pilóricos (Bisbal y Bengtson, 1995;

Sarasquete *et al.*, 1995), así como por la aparición de las enzimas proteolíticas (Cousin, *et al.*, 1987; Segner *et al.*, 1993; Walford y Lam, 1993; Gawlicka *et al.*, 1995; Ribeiro *et al.*, 1999).

HISTOLOGIA Y ANATOMIA DEL TUBO DIGESTIVO

Cuadro General

El tubo digestivo presenta varias características en común entre los principales grupos de vertebrados (Romer y Parsons, 1981), de tal modo que es posible distinguir varios componentes generales: bucofaringe, esófago, estómago, intestino y recto; sin mencionar los órganos accesorios como hígado y páncreas.

Entre los peces juveniles y adultos, a pesar de que el común denominador es que sufra varias torsiones y se mantenga estructuralmente dividido en varias partes funcionales, el tubo digestivo muestra una gran diversidad en forma y función, dependiendo de los hábitos alimentarios (Stroband y van der Veen, 1981) (Fig. 1). Pueden distinguirse generalmente, bucofaringe, esófago, estómago e intestino, con algunas subdivisiones de este último (Fänge y Grove, 1979; Romer y Parsons, 1981; Smith, 1989; Segner, 1996). Sin embargo, también puede no encontrarse el estómago, o el intestino puede estar modificado. A pesar de tal diversidad, la función primordial es la misma: asegurar la ingestión, digestión y asimilación de los nutrientes adquiridos mediante el alimento suministrado.

Estructura histológica

El tubo digestivo presenta un plano histológico general que se aplica a los órganos que lo componen. De manera general, consta de cuatro túnicas que lo revisten y cubren, estas son la *túnica mucosa*, la *túnica submucosa*, la *túnica muscular* y la *túnica serosa* o *adventicia*. Cada una de ellas presenta características propias que las diferencian (Fig. 2) (Eliséiev *et al.*, 1983; Wheater *et al.*, 1985).

La *túnica mucosa* consta de tres láminas: epitelio, lámina propia de la mucosa (*propia mucosae*) y lámina muscular de la mucosa (*muscularis mucosae*).

El epitelio en las regiones anterior y posterior del tubo digestivo, generalmente es del tipo plano estratificado, mientras que en la porción media es del tipo cilíndrico simple, pudiendo presentar numerosas microvellosidades. Las glándulas en esta túnica pueden estar localizadas endoepitelialmente en la forma de células caliciformes.

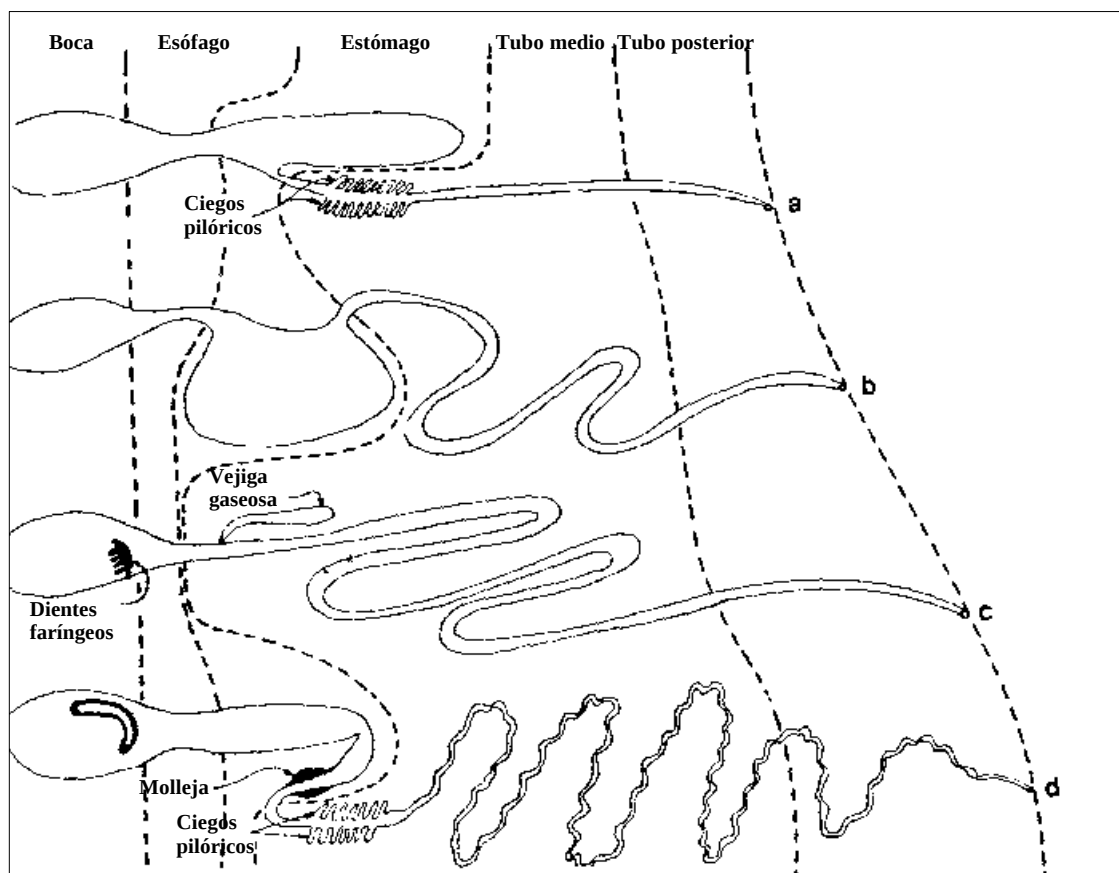


Figura 1.- Tipo de configuraciones del tubo digestivo en peces, en función de sus hábitos alimentarios cuando son adultos. a) Carnívoro, estómago en forma Y; b) omnívoro con preferencias carnívoras; c) omnívoro con preferencias herbívoras; d) micrófago, planctívoro. (Tomado de Smith, 1989).

La mucosa realiza diferentes funciones dependiendo de la región del tubo digestivo que se estudie, dichas funciones pueden inferirse tanto por la forma y estructura que presente (Fig. 3) (Eliséiev *et al.*, 1983; Wheater *et al.*, 1985).

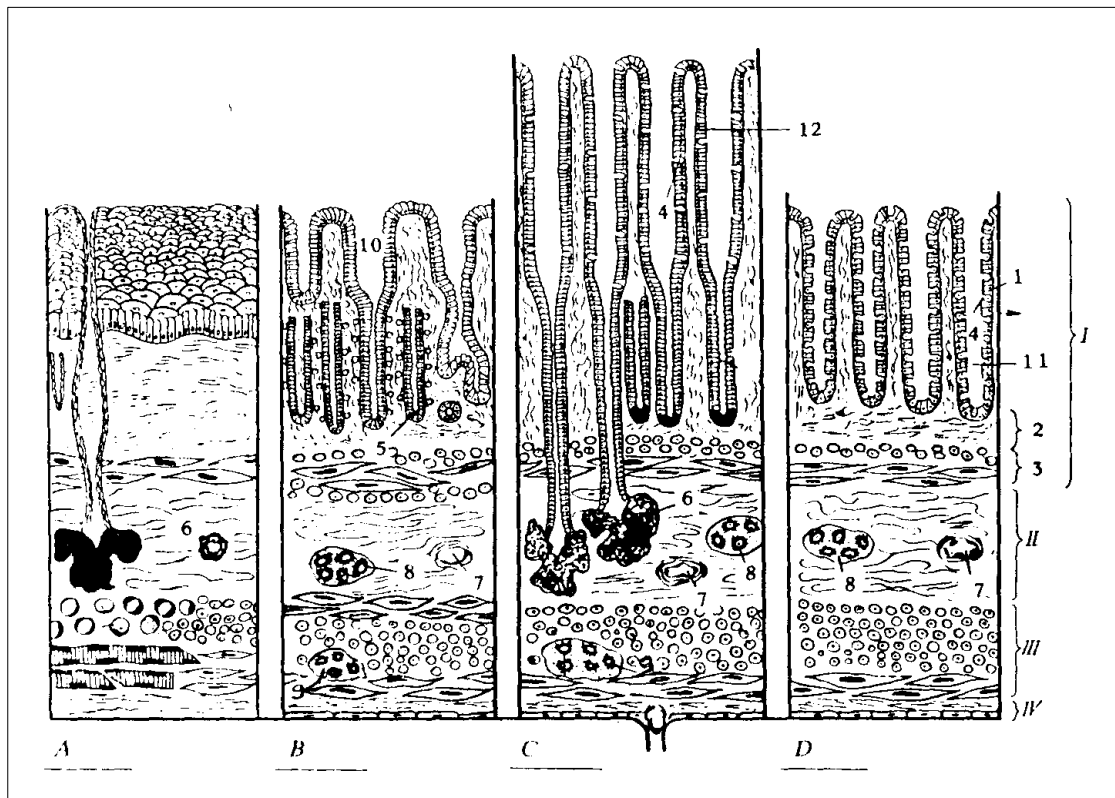
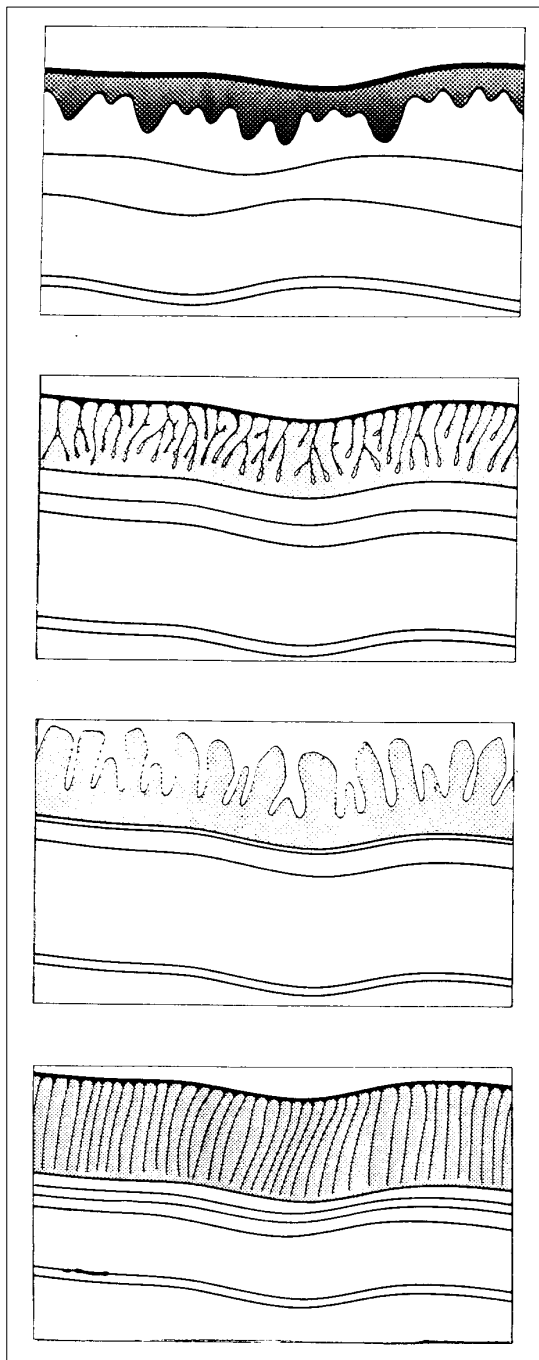


Figura 2.- Plano general de la estructura histológica del tubo digestivo. (Tomado de Eliséiev *et al.*, 1983). A) Esófago. B) Estómago. C) Int. Anterior. D) Int. Posterior.

I	Túnica mucosa	5	Glándulas de la lámina propia
II	Túnica submucosa	6	Glándulas de la submucosa
III	Túnica muscular	7	Plexos vasculares
IV	Túnica serosa	8	Plexo nervioso submucoso
1	Epitelio	9	Plexo nervioso intermuscular
2	Lámina propia de la mucosa	10	Fosas gástricas
3	Lámina muscular de la mucosa	11	Criptas intestinales
4	Células caliciformes	12	Vellosidades

La *túnica submucosa* se encuentra por debajo de la *túnica mucosa*, está formada principalmente por tejido conectivo laxo areolar, su presencia asegura la movilidad y formación de pliegues de la *túnica mucosa*. Es precisamente en esta zona, donde se

encuentran las glándulas complejas del tubo digestivo (Eliséiev *et al.*, 1983; Wheater *et al.*, 1985).



A.- Protección, se presenta en la cavidad bucal y en el esófago.

B.- Secreción, se encuentra en el estómago, se presentan glándulas ya sean simples o compuestas.

C.- Absorción, típica en el intestino anterior, se presenta en forma de vellosidades que aumentan el área de la superficie.

D.- Absorción y protección, presente en el intestino posterior, contiene glándulas tubulares y células caliciformes.

Figura 3.- Formas básicas y papel de la mucosa a lo largo del tubo digestivo. (Tomado de Wheater *et al.*, 1985).

La *túnica muscular* consta de dos capas musculares, una interna circular y una externa longitudinal. En las zonas anterior y posterior del tubo digestivo, las capas musculares son principalmente del tipo estriado, mientras que en la zona media consta principalmente del tipo liso. Ambos estratos musculares están separados por tejido conectivo laxo areolar, en el cual se encuentran vasos sanguíneos y el plexo nervioso intermuscular (*plexus nervorum intermuscularis*). Las contracciones musculares de esta túnica facilitan el movimiento y la mezcla del alimento a través del tubo digestivo (Eliséiev *et al.*, 1983; Wheater *et al.*, 1985).

La *túnica serosa* es la capa más externa que rodea al tubo digestivo, es decir, la hoja visceral del peritoneo, consta de tejido conectivo y del mesotelio que la rodea por fuera. Esta túnica está ausente en el esófago y en la zona del recto (Eliséiev *et al.*, 1983; Wheater *et al.*, 1985).

Estructura anatómica

Bucofaringe

La bucofaringe ocupa la región más anterior del tubo digestivo y su función es la de recibir e iniciar el proceso de digestión mediante procesos físicos. Histológicamente presenta la misma estructura en peces herbívoros y carnívoros. En sentido estricto, son dos cavidades conectadas entre sí: la cavidad bucal y la faringe. Ambas zonas comparten un epitelio plano estratificado, así como una submucosa de tejido conectivo areolar laxo. Las glándulas multicelulares raramente están presentes, siendo las más numerosas las células mucosas. La mucosa de la bucofaringe presenta protuberancias que van a formar las papilas gustativas que generalmente son filiformes y fungiformes. Los dientes varían en forma y posición, dependiendo de si se trata de una especie carnívora o herbívora. Generalmente, los primeros dientes en desarrollarse son los faríngeos, seguidos de los mandibulares. Ambos tipos de dientes pueden ser homodontos o heterodontos (Wheater *et al.*, 1985).

Esófago

La mayoría de los peces presentan un esófago corto, ancho y muscular, excepto los anguiliformes (Smith, 1989; Steffens, 1989). Lo revisten una mucosa consistente en un epitelio plano estratificado cuya función es, básicamente, la de protección, una túnica submucosa, las tunicas musculares y la túnica adventicia. Intercaladas en el epitelio, se encuentran algunas células mucosas, llamadas caliciformes, responsables de la secreción de mucus.

La capa muscular, está formada por músculo esquelético que facilita su distensión durante el paso de la comida por el esófago, del mismo modo, se presentan pliegues a todo lo largo del esófago que involucran a la mucosa y submucosa y que ayudan al paso del alimento (Kapoor *et al.*, 1975; Fänge y Grove, 1979).

Estómago

El estómago puede o no estar presente, dependiendo de los hábitos alimentarios; en los carnívoros, presenta una gran variedad de formas (Fig. 1). De manera general, presenta un epitelio cilíndrico simple sin borde plumoso. Las células caliciformes son escasas e incluso ausentes. Las glándulas gástricas se presentan en el cardias y el fondo. La submucosa presenta tejido conectivo laxo areolar y algunas fibras de músculo liso. El esfínter pilórico consiste de un engrosamiento de la capa muscular circular y se conecta directamente al intestino. Es precisamente en el estómago donde se lleva a cabo la digestión del alimento ingerido mediante la acción de las enzimas secretadas por las glándulas gástricas (Kapoor *et al.*, 1975; Fänge y Grove, 1979).

Intestinos

Pueden ser cortos y rectos en los carnívoros, o largos y con torsiones en los herbívoros. Los peces carnívoros presentan tubos ciegos conectados a la porción anterior del intestino, dichos tubos se conocen como ciegos pilóricos y su número varía

de 1 a 1000 (García-Gallego y Sanz-Rus, 1987) dependiendo de la especie (Fänge y Grove, 1979). Estos ciegos pueden estar libres o unidos entre sí e histológicamente son muy parecidos al intestino. Tanto en peces herbívoros, como carnívoros, la mucosa del intestino presenta un epitelio cilíndrico simple con un borde plumoso de microvellosidades, se presentan células caliciformes intercaladas y no se observan glándulas complejas. La submucosa es delgada y contiene fibras de colágeno y elásticas.

La túnica muscular está compuesta por dos capas musculares: una capa circular, y una capa longitudinal. En algunas ocasiones se distinguen un intestino anterior y un intestino posterior separados por un septo localizado a los 2/3 de la longitud del intestino, que se conoce como válvula intestinal. La región distal del intestino posterior se conoce como recto. Generalmente, se acepta que ambos intestinos son los responsables de absorber los nutrientes alimenticios después de que ocurre la digestión en el estómago. El área de superficie en el intestino de los peces se incrementa mediante la formación de pliegues de la mucosa, sin embargo, su longitud es menor a la del cuerpo en los peces carnívoros a diferencia de los herbívoros y detritívoros, cuya longitud intestinal puede ser hasta 20 veces la longitud corporal (Kapoor *et al.*, 1975; Reifel y Travill, 1978; Fänge y Grove, 1979; Stroband y Dabrowski, 1979; Pandian y Vivekanandan, 1985; Calzada, 1996).

Bajo este contexto general y en función de los hábitos alimentarios de *Paralabrax maculatofasciatus*, se espera que el desarrollo ontogenético del tubo digestivo de las larvas de la cabrilla arenosa siga un patrón básico establecido previamente (Tanaka, 1973). De esta forma, se plantearon los siguientes objetivos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Establecer las características morfológicas e histológicas del desarrollo ontogenético del tubo digestivo de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Describir histológicamente, de manera detallada, el desarrollo ontogenético del tubo digestivo durante el periodo larval de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*.

2.- Caracterizar, en el ámbito histológico, el proceso de absorción de proteínas, lípidos y carbohidratos durante el desarrollo ontogenético del tubo digestivo de las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*.



MATERIAL Y METODOS

Obtención y mantenimiento de las larvas.

Los huevos se obtuvieron de desoves espontáneos de reproductores de la cabrilla arenera (Rosales-Velázquez, 1997) y se mantuvieron en una tolva de incubación con un volumen aproximado de 100 litros hasta el momento de la eclosión, lo cual ocurrió entre las 24 y 26 horas después del desove. Una vez que los huevos eclosionaron, los eleuteroembriones se trasladaron a un sistema de cultivo de circulación cerrada (SCC-12) que consta de 12 tanques de 140 litros en la Unidad Piloto de Maricultivos (UPIMA) del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR). Dicho sistema, cuenta con una bomba de recirculación de 1.5 caballos de fuerza, un filtro de cartucho modelo CFR, un filtro biológico marca Sea Storm, un espumador de albúminas, un termostato de titanio y un sistema de luz ultravioleta modelo PM4, los cuales aseguran la calidad del agua. La densidad de siembra fue de 150 eleuteroembriones/l y se mantuvieron durante un total de 30 días.

Las condiciones de cultivo durante los 30 días de duración del experimento fueron monitoreadas diariamente (Strickland y Parsons, 1972), manteniendo los siguientes valores: salinidad $35 \text{ ppm} \pm 0.5$; temperatura $25.2 \pm 0.2 \text{ }^{\circ}\text{C}$; oxígeno disuelto 4.0 ± 0.2 ; nitritos 0.09 ± 0.04 ; nitratos 0.49 ± 0.04 ; y amonio 0.32 ± 0.04 .

Las larvas fueron alimentadas diariamente a saciedad con rotíferos *Brachionus plicatilis* de tipo S y con una longitud lórica de 50-300 μm , desde el

día 2 hasta el 13 después de la eclosión (dde). Posteriormente, con nauplios de *Artemia*, enriquecidos con Selco™ durante 4 a 6 hrs, desde el día 12 hasta el día 17 dde. Con juveniles de *Artemia* desde el día 14 al 26 dde, y a partir del día 20 con una dieta de consistencia semihúmeda. El contenido proteico de la dieta era de 50% y el contenido de lípidos totales fue de 20%. La dieta se suministró en forma de pequeños grumos, que fueron aumentando de tamaño conforme ocurría el crecimiento de las larvas.

Obtención de muestras.

Diariamente, desde el día 0 (momento de la eclosión) hasta el día 14 y posteriormente cada dos días hasta el día 30 dde, se obtuvo una muestra de aproximadamente 40 individuos directamente de los tanques (Anexo 1). Las muestras se obtuvieron a la misma hora durante los 30 días. Los organismos obtenidos fueron anestesiados con metil sulfonato de tricaina (MS 222) a una concentración de 35 mg/l y se realizó la medición de la longitud total y del glóbulo de aceite con la ayuda de un microscopio estereoscópico (0.8x :0.12mm, 1.2x :0.77mm, 2x :0.47mm, 6x :0.018mm). Posteriormente se fijaron utilizando un fijador específico para cada técnica histológica. Se calculó la longitud total (LT) promedio para cada día de muestreo. Las larvas que presentaban o que se aproximaban a la longitud total promedio diaria, fueron utilizadas para las técnicas histológicas e histoquímicas.

Desarrollo del tracto digestivo.

De la totalidad de las larvas obtenidas, una cuarta parte fue procesada para llevar a cabo el seguimiento del desarrollo del tracto digestivo. Las larvas se fijaron en formol al 10%. Se utilizó la técnica de doble inclusión alginato-parafina (Basch, 1986; Muñetón-Gómez *et al.*, 1989) que consiste en incluir las larvas en una

solución de alginatos Algimar A (1%) (Planta Piloto CICIMAR), con un pH de 8, una viscosidad de 720 cps y una humedad de 10%. Posterior a la inclusión en alginato, las larvas fueron deshidratadas en alcohol butílico en varias graduaciones, e inmediatamente después se incluyeron en parafina Histosec de Merck™ con un punto de fusión de 58 °C (Anexo 1). La doble inclusión se realizó en larvas de hasta 12 días de edad, las larvas mayores a 12 días se incluyeron directamente en parafina.

Utilizando un microtomo de rotación, se realizaron series de cortes histológicos de las larvas de 7 µm de espesor en un plano longitudinal. Los cortes se tiñeron con la técnica Hematoxilina-Eosina (H-E), la cual permite observar los rasgos generales del desarrollo del tracto digestivo (Anexo 2). Las preparaciones histológicas fueron montadas con resina sintética.

Histoquímica del tracto digestivo.

Carbohidratos

El resto de las larvas obtenidas, se destinó a la descripción histoquímica del tracto digestivo. Las larvas se fijaron con formol al 10 %. Se llevó a cabo la técnica de doble inclusión alginato-parafina tal y como se desarrolló en la sección anterior. Posteriormente, se realizó la deshidratación e inclusión definitiva en parafina (Anexo 1). Se realizaron cortes en el plano longitudinal de 7 µm de espesor. Para detectar la asimilación de carbohidratos, se utilizó la técnica ácido peryódico de Schiff (PAS) para mucopolisacáridos (Davenport, 1960; Spannhof, 1966). En el Anexo 2 se muestran los tiempos utilizados en la tinción PAS. Posterior a la tinción, las preparaciones histológicas fueron montadas con resina sintética.

Proteínas

La asimilación de proteínas se detectó con la técnica: Ninhidrina-Schiff (N-S) para grupos amino, la cual permite diferenciar entre las proteínas asimiladas por el tracto digestivo y las proteínas constituyentes del mismo (Davenport, 1960; Spannhof, 1966). Para esta técnica, las larvas se fijaron con formol neutro al 4%. Se llevó a cabo la doble inclusión alginato-parafina, tal como fue descrito en las secciones anteriores, seguido de la inclusión definitiva en parafina, los cortes realizados fueron de 7 μm . En el Anexo 2 se muestran los tiempos de inmersión en los reactivos de la técnica Ninhidrina-Schiff.

Lípidos

Para detectar la absorción de lípidos durante la ontogénesis del tracto digestivo, se realizó un análisis microscópico de los cortes histológicos adquiridos con las técnicas H-E, PAS y N-S, en busca de características tisulares que permitieran describir un patrón de absorción de lípidos por parte del intestino (Tanaka, 1973).

Descripción de Resultados

Una vez que se obtuvieron las preparaciones con los cortes histológicos de las larvas, tanto para el desarrollo del tubo digestivo, como para la absorción de proteínas, lípidos y carbohidratos, se realizó la descripción y caracterización de cada una de ellas con la ayuda de un microscopio óptico marca Olympus, modelo CH-2 (2.5x, 10x, 40x, 100x). Los cortes representativos de cada etapa del desarrollo fueron registrados mediante fotografías con una cámara marca Canon de 35 mm. Tanto las técnicas histológicas e histoquímicas, como la identificación y

descripción de las preparaciones histológicas, se realizaron en el laboratorio de Morfofisiología del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas.

Análisis estadístico

Para representar la curva de crecimiento de los organismos utilizados, la longitud total se ajustó a un modelo exponencial y se obtuvo la ecuación de crecimiento.



RESULTADOS

DESARROLLO ONTOGENETICO DEL TUBO DIGESTIVO

Desarrollo morfológico del tubo digestivo.

Los eleuteroembriones emergieron (día 0) con una LT promedio de 1.6 ± 0.1 mm (n=40) a una temperatura de $25.2 \pm 0.2^\circ\text{C}$. Durante los primeros 14 días de desarrollo, la tasa de crecimiento se mantuvo baja, sin embargo, a partir del día 15, se notó un incremento considerable, hasta alcanzar una LT promedio de 26.6 ± 2.6 mm (n=40) en el día 30 dde (Fig. 4).

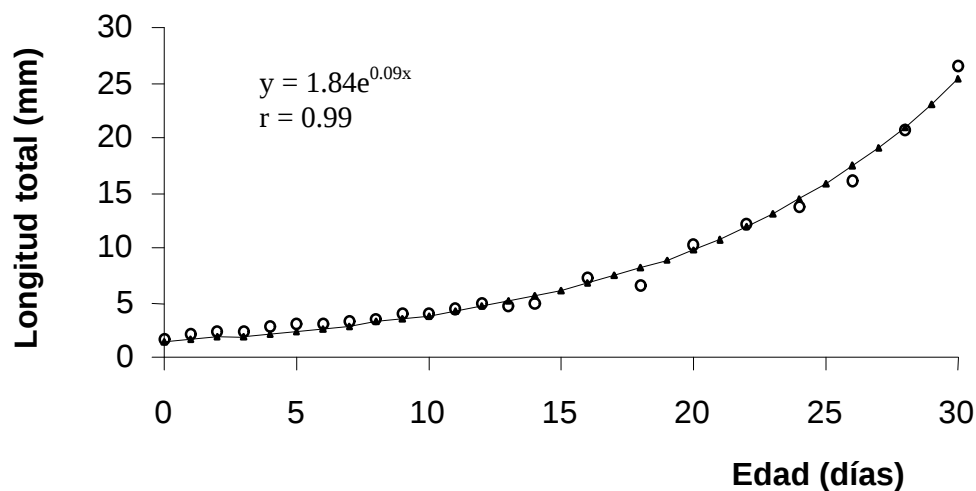


Figura 4.- Curva de crecimiento de las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*, ajustado a un modelo exponencial. o Valores observados, ▲ Valores estimados.

Al momento de la eclosión, el tubo digestivo se presentó como un tubo recto indiferenciado cerrado por ambos extremos, que para fines prácticos, se dividió en tres regiones: anterior, medio y posterior. El tubo digestivo yace en una posición dorso-posterior al saco vitelino, el cual ocupa gran parte del cuerpo con un diámetro promedio de 0.8 ± 0.1 mm ($n=40$), y presenta un solo glóbulo de aceite inmerso en posición ventral-anterior, cuyo diámetro promedio fue de 0.2 ± 0.1 mm ($n=40$). Los ojos no estaban pigmentados. Para el día 1 dde, el tubo digestivo sufre una ligera curvatura que involucra principalmente a la región posterior (Fig. 5).

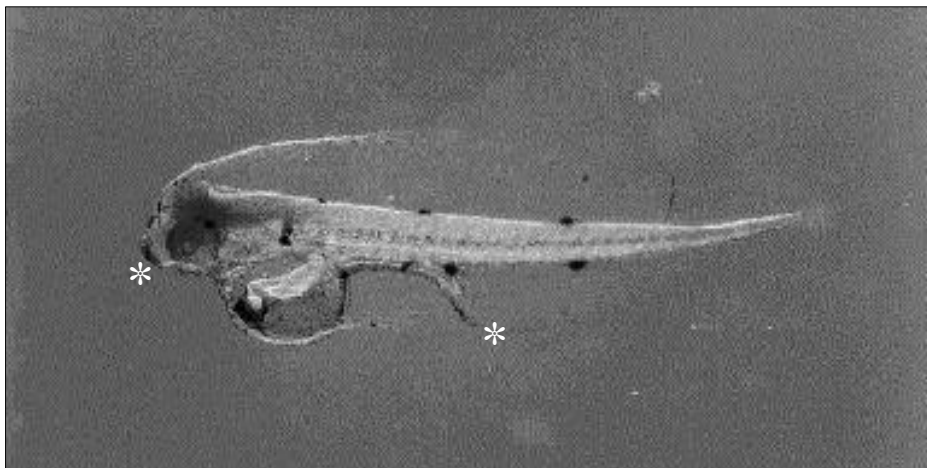


Figura 5.- Eleutheroembrión de 1 día dde. LT promedio = 2.1 ± 0.1 mm ($n=40$). Nótese el tubo digestivo curvado en la región posterior (→) los ojos sin pigmentar, la boca y el ano cerrados (*). 5x.

A partir del segundo día, da inicio el proceso de diferenciación del tubo digestivo con la aparición de la válvula intestinal, se abren tanto la boca como el ano. Sin embargo, aún se presentan remanentes del saco vitelino y del glóbulo de aceite (Fig. 6).

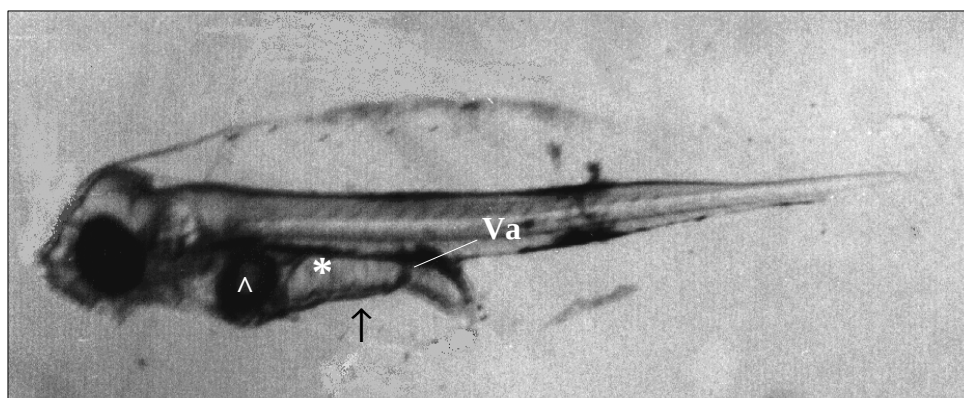


Figura 6.- Eleutheroembrión de 2 días dde. LT promedio = 2.6 ± 0.1 mm ($n=40$). El tubo digestivo ha comenzado a diferenciarse (↑), nótese los pliegues a lo largo del tubo digestivo(*) y la válvula intestinal (Va), los ojos están pigmentados y la boca y el ano están abiertos (○). Se distinguen los remanentes del saco vitelino y del glóbulo de aceite (^). 5x.

Para el día 3 dde, se agotan tanto las reservas vitelinas como el glóbulo de aceite y da inicio el proceso de diferenciación del estómago (Fig. 7).

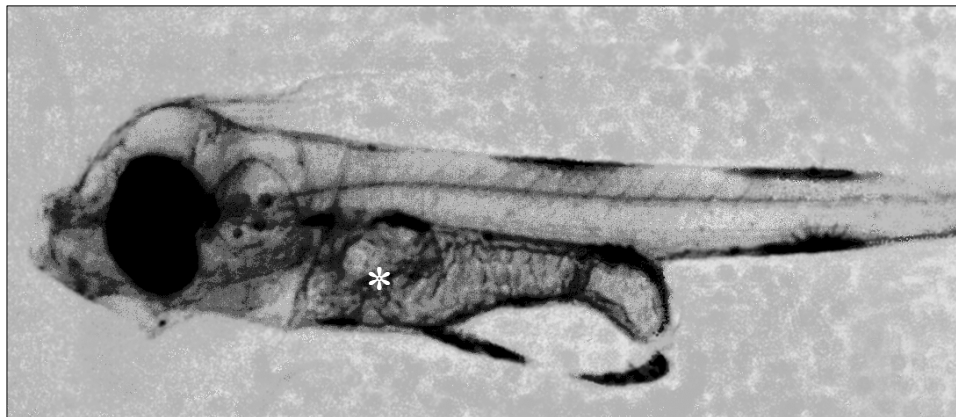


Figura 7.- Larva de 3 días dde. LT promedio = 2.4 ± 0.1 mm (n=40). Inicia la diferenciación del estómago (*). Nótese la ausencia tanto del saco vitelino como del glóbulo de aceite. 5x.

Durante el mismo día 3 dde, continuó la diferenciación del resto de los componentes del tubo digestivo, pero no fue sino hasta el día 5 dde cuando las larvas presentaron una LT promedio de 3.0 ± 0.3 mm (n=40), en que el tubo estuvo completamente diferenciado en seis zonas principales: bucofaringe, esófago, estómago, intestino anterior, intestino posterior y recto (Fig. 8).

A partir de ese momento, el tubo digestivo sufrió numerosas modificaciones y arreglos, tales como la torsión y el desarrollo de nuevos pliegues de la mucosa. Cuando las larvas presentan una LT de 9.3 mm, que puede ser a partir del día 16, el tubo digestivo adquiere la forma final, presente en juveniles y adultos (Fig. 9).

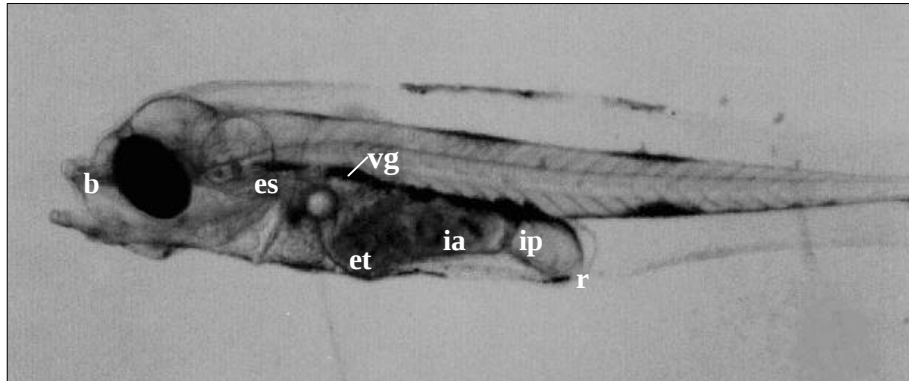


Figura 8.- Larva de 5 días dde. LT promedio = 3.0 ± 0.3 mm (n=40). Diferenciación del tubo digestivo en seis zonas principales: bucofaringe (b), esófago (es), estómago (et), intestino anterior (ia), intestino posterior (ip) y recto (r). Nótese la vejiga gaseosa (vg). 5x.

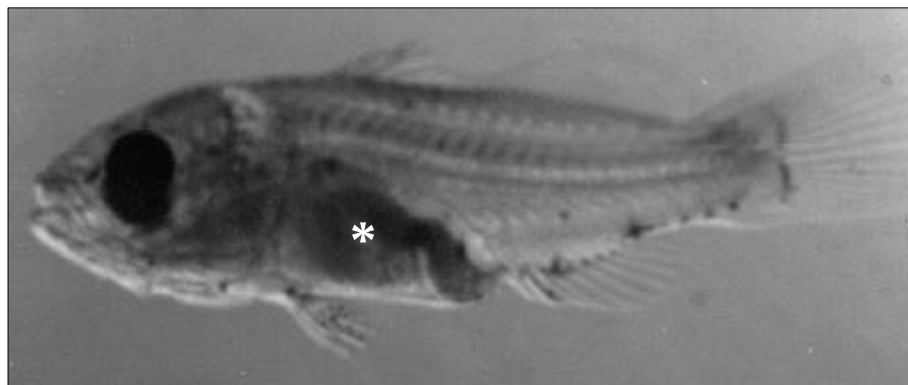


Figura 9.- Larva de 16 días dde. LT = 9.3 mm. Nótese el tubo digestivo totalmente desarrollado (*). 5x.

Desarrollo histológico del tubo digestivo

Bucofaringe

Al momento en que se abrió la boca (día 2 dde), la bucofaringe estaba revestida por una mucosa formada por epitelio plano simple de origen ectodérmico y no presentaba ninguna estructura asociada como dientes ó papilas gustativas. La submucosa estaba formada por una capa de células de tejido conectivo laxo areolar. Se distinguen algunos cartílagos mandibulares y branquiales iniciando su desarrollo (Fig. 10).

A partir del día 3 dde, aumentó el número de capas celulares de la túnica mucosa, por lo que el epitelio se consideraba plano estratificado. No se observan células caliciformes (Fig. 11).

Al día 5, ya están presentes los arcos branquiales (Fig. 12), sin embargo, aún no se desarrollan los filamentos branquiales. Se distinguen las capas de la túnica muscular. El número de fibras musculares se incrementó. En el día 6 aparecen las primeras células caliciformes (Fig. 13).

En el día 7 se hacen visibles los primordios branquiales, emergen de la superficie inferior de los cartílagos branquiales, que ya están bien desarrollados. Para el día 9 dde se distinguen los filamentos branquiales (Fig. 14).

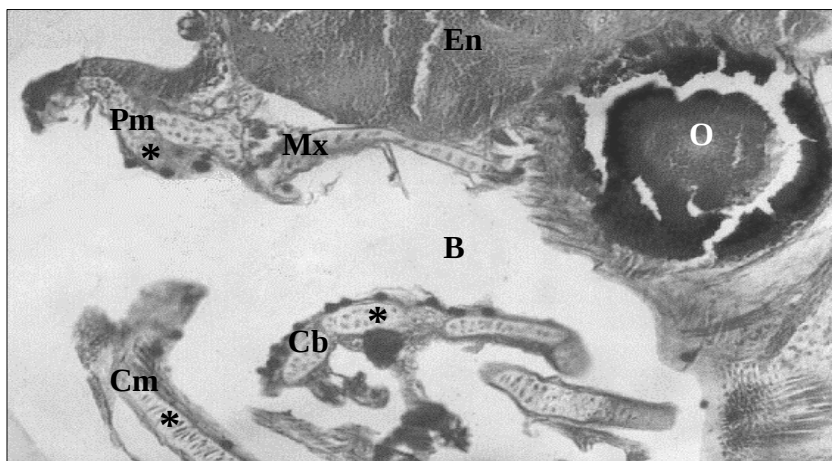


Figura 10.- Larva de 3 días dde. Bucofaringe (B) con cartílagos mandibulares (*). H-E. 40x.

Pm: Premaxila

Mx: Maxila

Cm: Cartílago de Meckel

Cb: Cartílagos branquiales

O: Ojo

En: Encéfalo

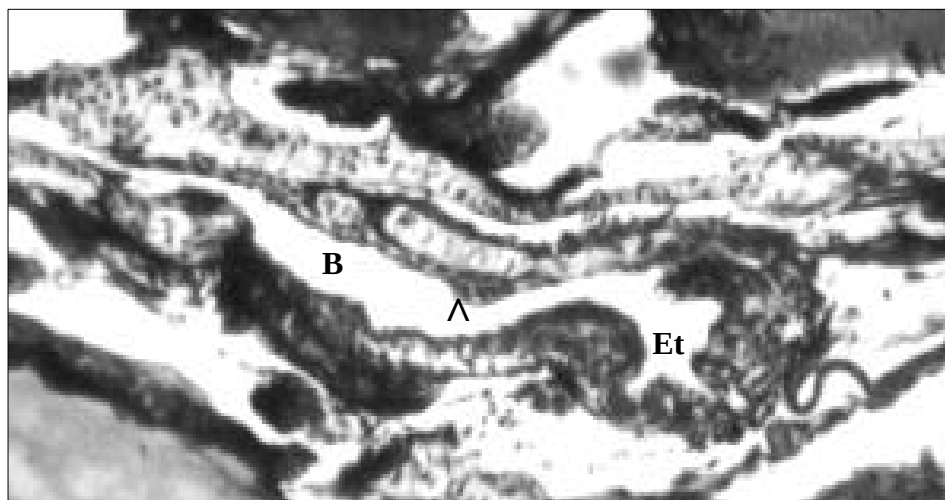
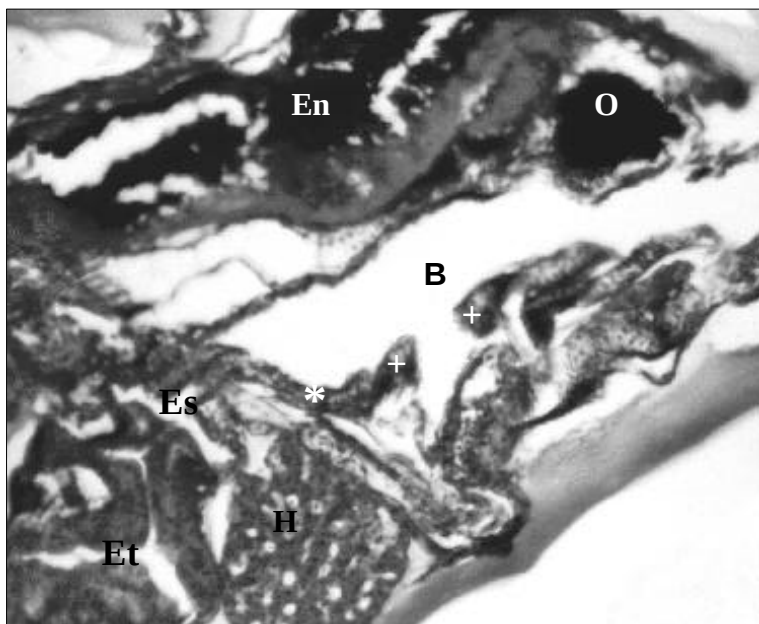


Figura 11.- Larva de 4 días dde. Aumentó el grosor de la mucosa en la bucofaringe a un epitelio plano estratificado (^). No se distinguen células caliciformes. H-E. 10x.

B: Bucofaringe

Et: Estómago



←
Figura 12.- Larva de 5 días dde. Se distinguen los arcos branquiales (+) y las fibras musculares (*). H-E. 10x.

B: Bucofaringe

En: Encéfalo

Es: Esófago

Et: Estómago

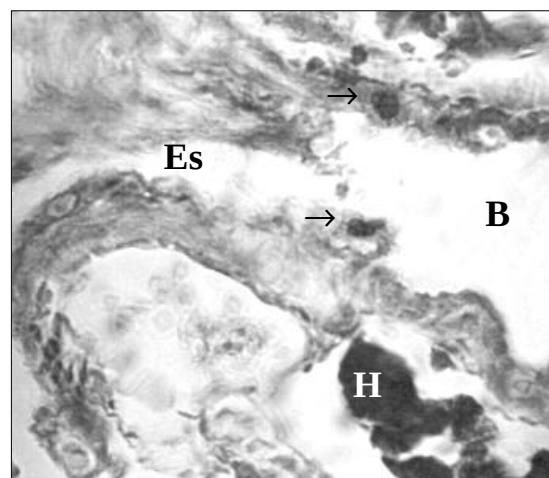
H: Hígado, nótese el número de conductos hepáticos y la formación en hileras de los hepatocitos

O: Ojo

→
Figura 13.- Larva de 6 días dde. Nótese las primeras células caliciformes (→) en la bucofaringe (B). PAS. 40x.

H: Hígado

Es: Esófago



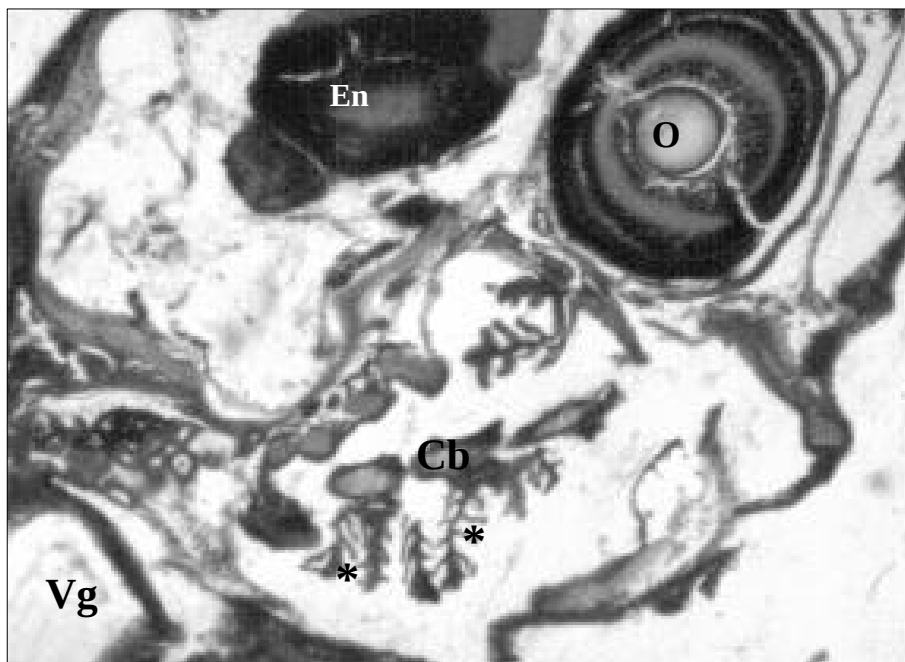


Figura 14.- Larva de 9 días dde. Se han formado los filamentos branquiales (*). H-E. 10x.

Cb: Cartílagos branquiales
O: Ojo

Vg: Vejiga gaseosa
En: Encéfalo

A partir del día 10 dde, se observan dos ligeras elevaciones en la mucosa del techo de la bucofaringe, que a la postre forman los dientes faríngeos (Fig. 15). Comienzan a formarse las papilas gustativas (Fig. 16).

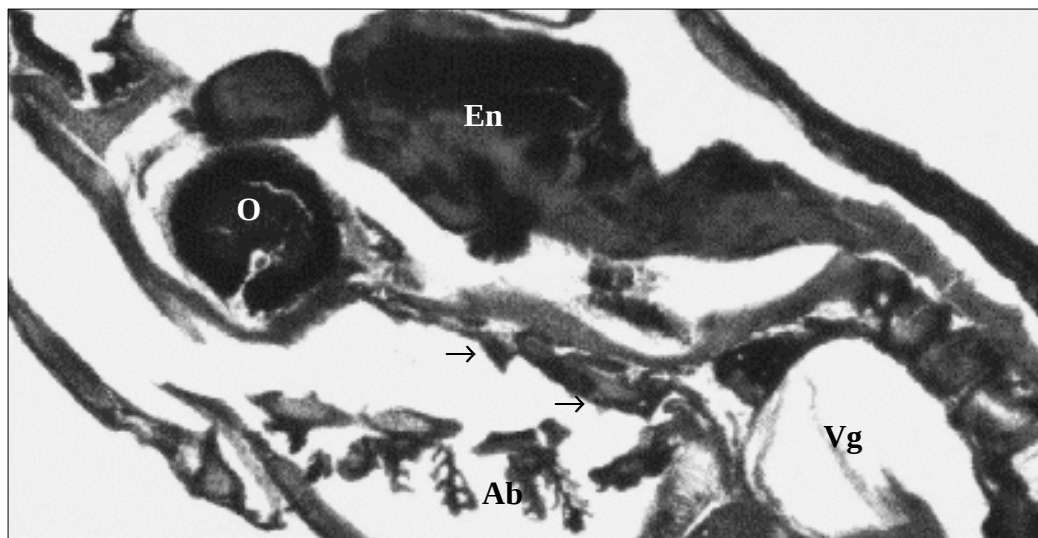


Figura 15.- Larva de 10 días dde. Aparecen los primeros dientes faríngeos (→). H-E. 10x.

O: ojo

Ab: Arcos branquiales

En: Encéfalo

Vg: Vejiga gaseosa

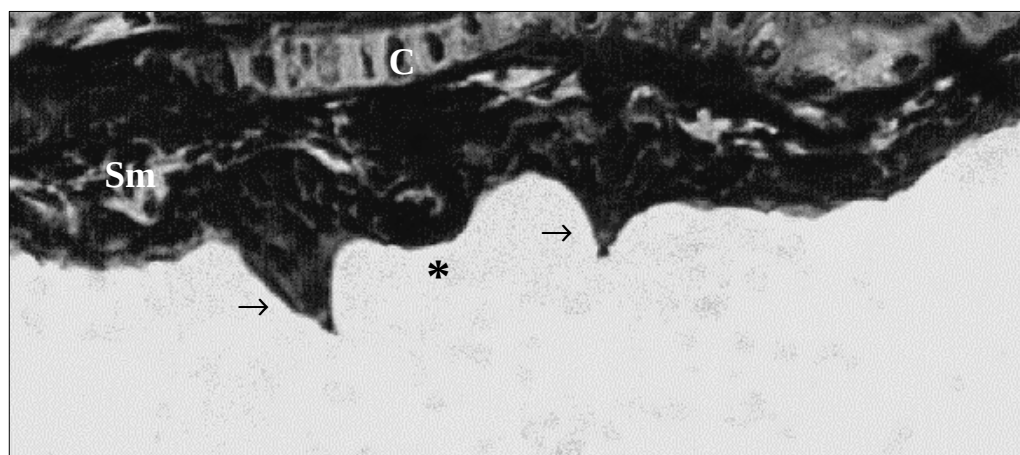


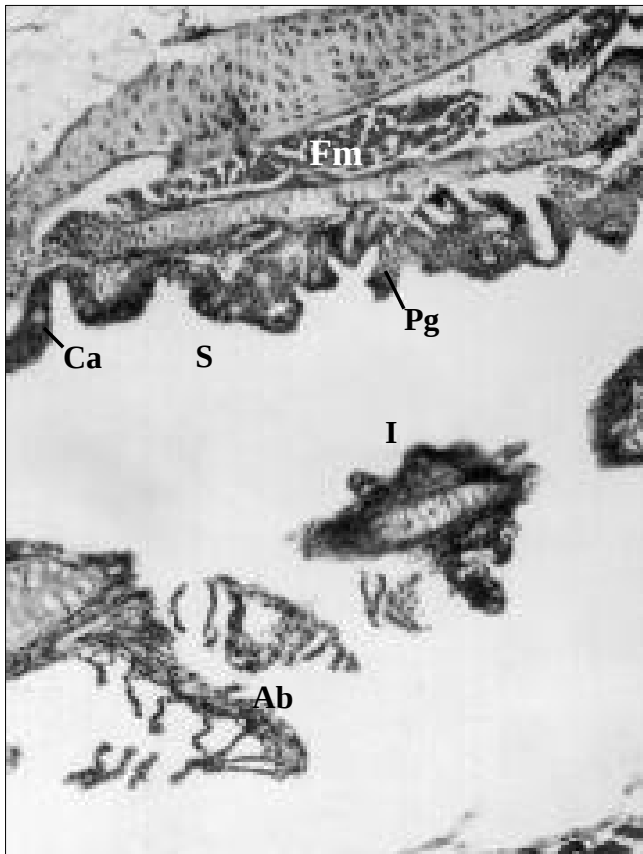
Figura 16.- Larva de 10 días dde. Nótese el inicio de la formación de una papila gustativa (*) rodeada por dos dientes faríngeos (→). H-E. 40x.

Sm: Túnica submucosa

C: cartílago

Durante los siguientes días aumenta el número de capas celulares de las tónicas que recubren la bucofaringe, tanto epiteliales en la mucosa, de tejido conectivo en la submucosa, como de fibras musculares en la muscular.

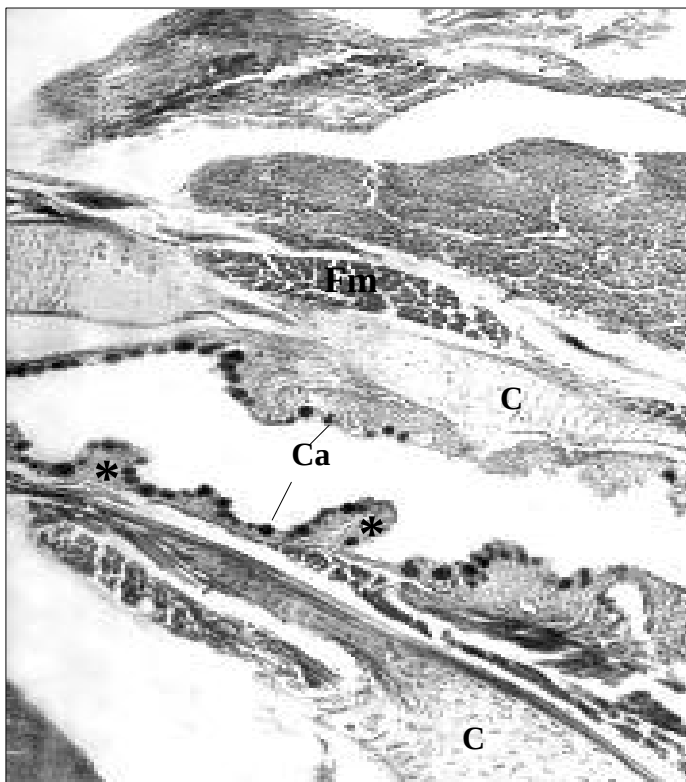
Para el día 16, la mucosa del techo de la bucofaringe ha desarrollado una mayor cantidad de capas celulares que el piso de la misma. Se observan las papilas gustativas bien formadas, así como numerosas células caliciformes intercaladas en las células epiteliales (Fig. 17).



←
Figura 17.- Larva de 16 días dde. Nótese que el grosor de la superficie superior de la bucofaringe (S) es mayor al de la inferior (I). H-E. 10x.

Ab: Arcos branquiales
Ca: Células caliciformes
Fm: Fibras musculares
Pg: Papilas gustativas

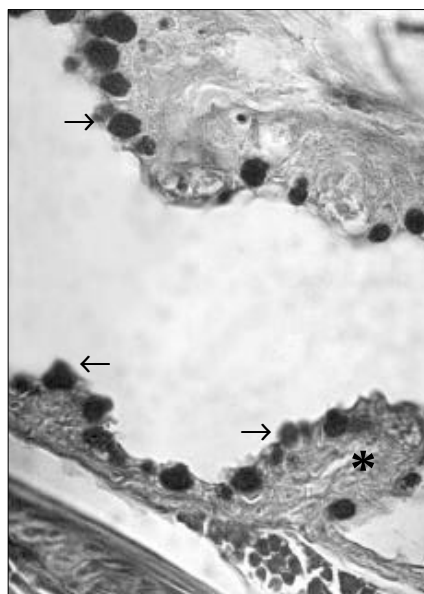
Al día 22 dde, las papilas gustativas están bien formadas (Fig. 18). Los dientes faríngeos son más grandes y las células caliciformes más numerosas (Fig. 19).



←
Figura 18.- Larva de 22 días dde. Papilas gustativas bien desarrolladas (*) en la superficie inferior de la bucofaringe. PAS. 10x.

C: Cartílago
Ca: Células caliciformes
Fm: Fibras musculares

→
Figura 19.- Larva de 22 días dde. Papila gustativa (*) y células caliciformes (→) bien desarrolladas. PAS. 40x.



Esófago

Cuando el eleuteroembrión emerge (día 0), el tubo digestivo primordial no presenta regionalización visible (Fig. 5). Histológicamente, esta revestido por un epitelio cúbico-cilíndrico en toda su longitud. El lumen no está totalmente desarrollado. A partir del día 1 dde, el epitelio de la región proximal del tubo anterior comienza a cambiar a un epitelio plano simple, descansando sobre una delgada línea de fibras conectivas.

Los primeros indicios del desarrollo del esófago ocurren después de abrirse la boca, cuando en la región distal del tubo anterior comienza a formarse el estómago al día 3 (Fig. 7), dejando la región proximal sin cambios, la cual se diferencia en el esófago. Para el día 5, el esófago está bien diferenciado (Fig. 20), es corto y el epitelio cambia a un tipo estratificado plano. La túnica submucosa permanece con pocas fibras y la túnica muscular ha comenzado a formarse. El cambio del tipo de epitelio entre esófago (epitelio plano estratificado) y estómago (epitelio cilíndrico) ocurre de manera súbita (Fig. 21).

A partir del día 6 dde, se pueden distinguir dos regiones principales en el esófago, una anterior y una posterior, ambas constituidas por un epitelio plano estratificado y numerosas células caliciformes. Sin embargo, en la región posterior se presenta una serie de pliegues longitudinales musculares, los cuales constriñen la unión con el estómago, más adelante en el desarrollo, estos pliegues forman el esfínter esofágico (Fig. 22).

Las túnicas submucosa y muscular no se han desarrollado completamente, la primera está formada por una ligera capa de tejido conectivo y en la segunda sólo se distinguen algunas fibras de músculo liso y estriado.

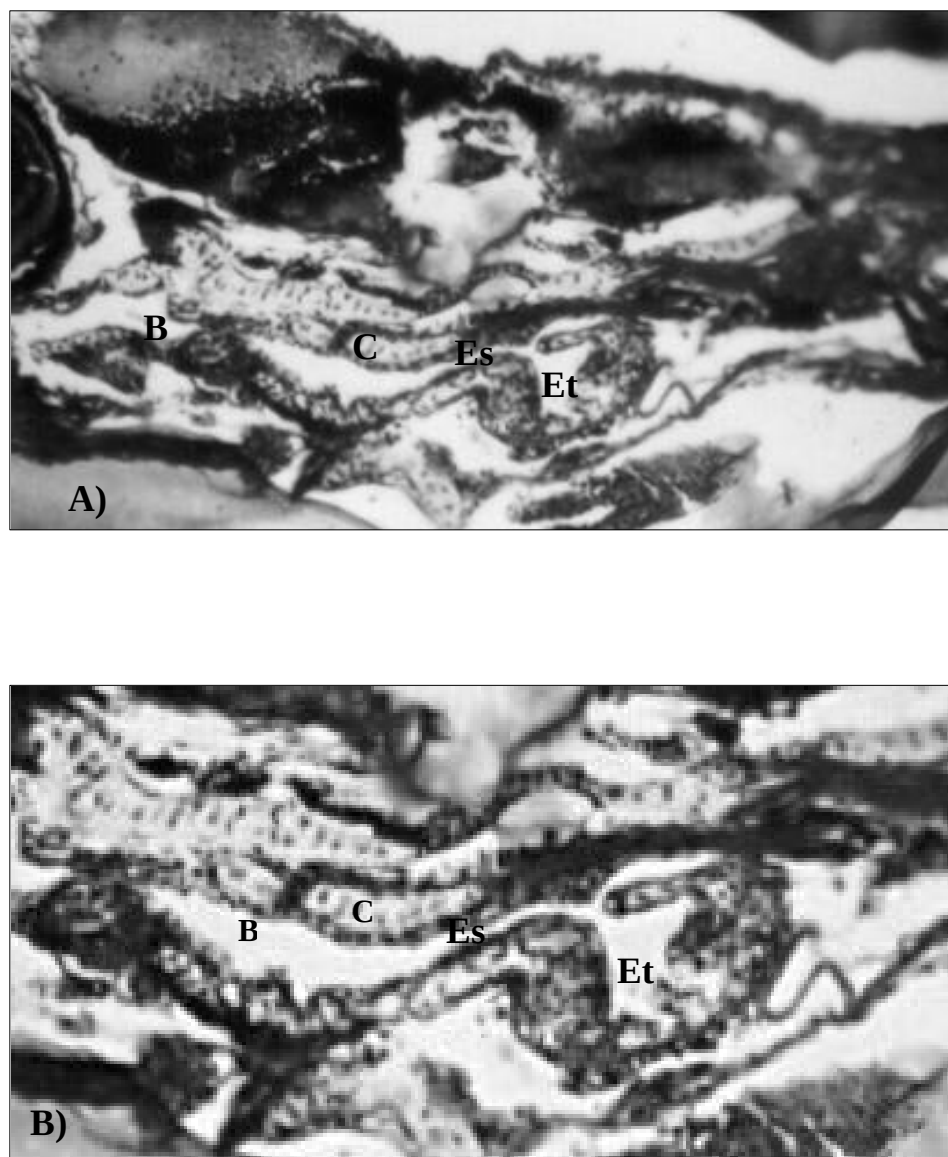


Figura 20.- Larva de 5 días dde. Formación del esófago. A) H-E. 10x. B) H-E. 40x.

B: Bucofaringe
Es: Esófago

C: Cartílago
Et: Estómago

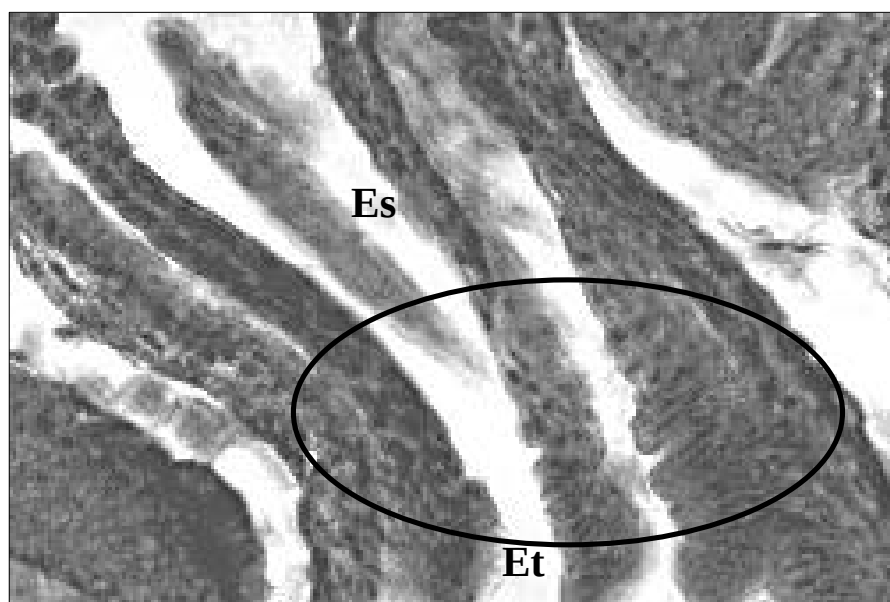


Figura 21.- Larva de 5 días dde. Transición epitelial entre esófago y estómago (O). H-E. 40x.

Es: Esófago

Et: Estómago

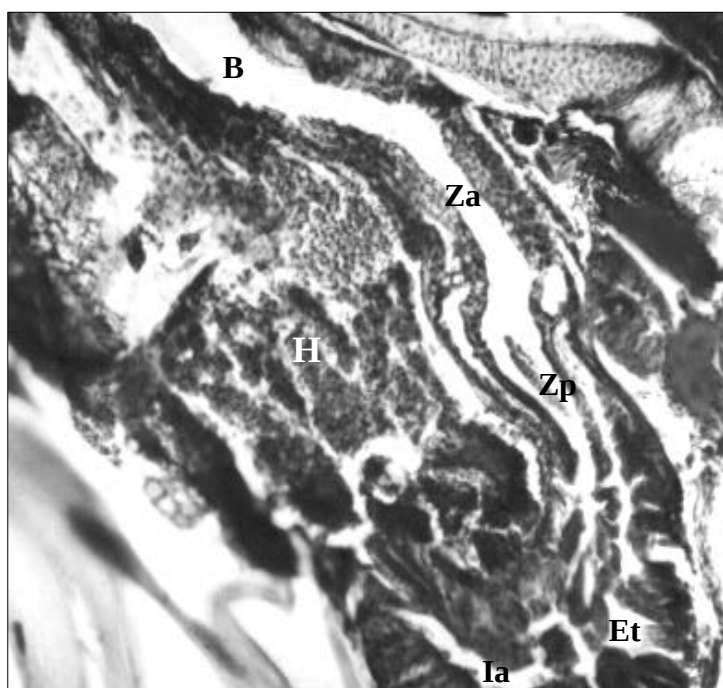


Figura 22.- Larva de 6 días dde. Zonas anterior y posterior del esófago. Nótese las células caliciformes en la región anterior (Za) y los pliegues longitudinales en la región posterior (Zp). H-E. 10x.

B: Bucofaringe

Et: Estómago

Ia: Intestino anterior

H: Hígado

Las dos capas musculares del esófago ya se distinguen en el día 10, aunque no están completamente desarrolladas, sin embargo, se desarrollan completamente en el día 18. A partir del día 22 el esófago está bien desarrollado (Figs. 23, 24).

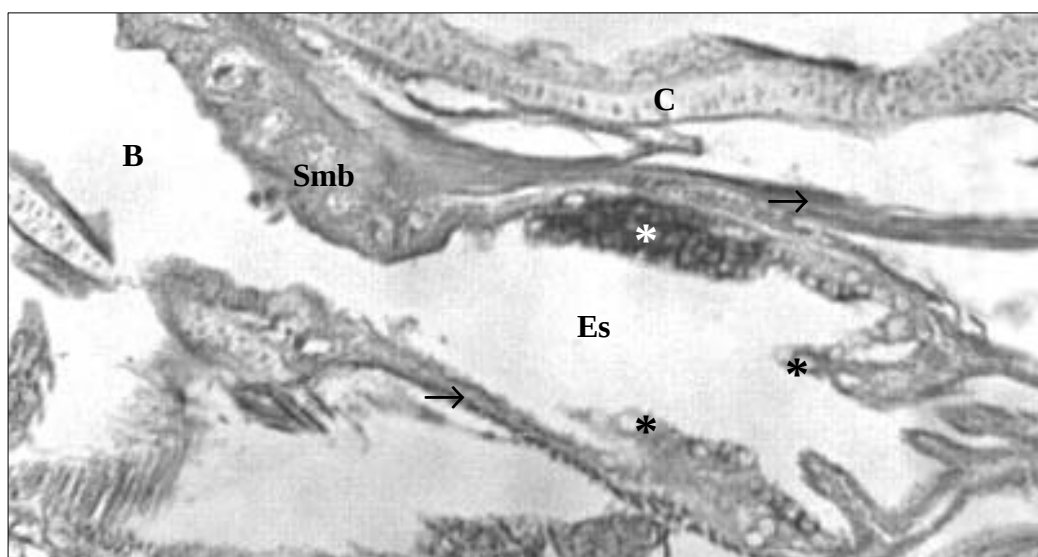


Figura 23.- Larva de 22 días dde. Región anterior del esófago. Nótese el gran número de células caliciformes (*) así como la capa muscular longitudinal bien desarrollada (→). H-E. 10x.

B: Bucofaringe
C: Cartílago

Smb: Submucosa de la bucofaringe
Es: Esófago

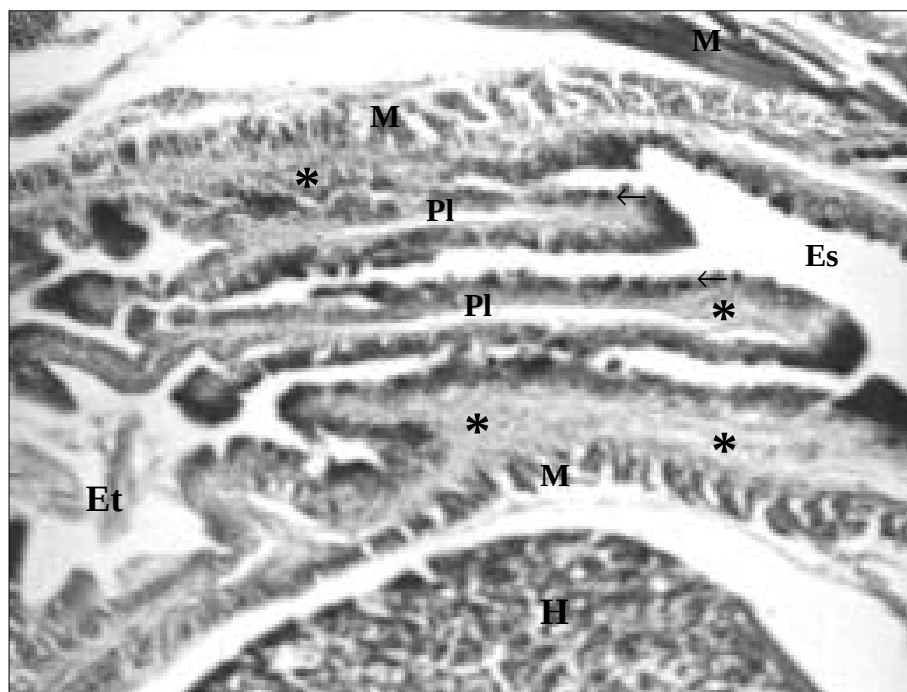


Figura 24.- Larva de 22 días dde. región posterior del esófago. Nótese dos grandes pliegues longitudinales (Pl) con numerosas células caliciformes (→). La túnica submucosa está muy desarrollada (*). PAS. 40x.

Es: Esófago
H: Hígado

Et: Estómago
M: Túnica muscular

Estómago

Al momento de la eclosión, los eleuteroembriones carecen de estómago (Fig. 5). A partir del día 1 dde, el epitelio distal de la parte anterior del tubo digestivo comienza a cambiar a un epitelio cúbico simple. Al día 2 dde, la parte anterior del tubo digestivo presenta un diámetro mayor al de las partes media y posterior. Al mismo tiempo, inicia la formación de pliegues de la mucosa (Fig. 6).

Para el día 3, la parte anterior del tubo digestivo sufre un ensanchamiento, iniciando el proceso de diferenciación del estómago (Figs. 7 y 25).

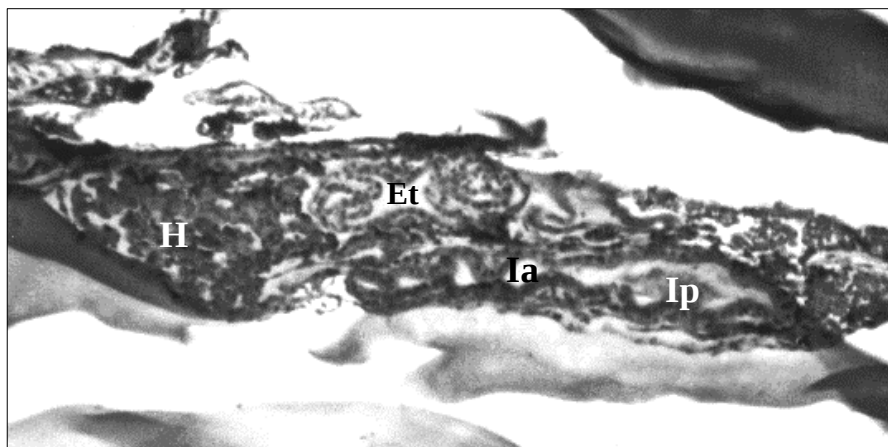


Figura 25.- Larva de 3 días dde. Nótese el estómago en formación en posición dorsal al intestino anterior. H-E. 10x.

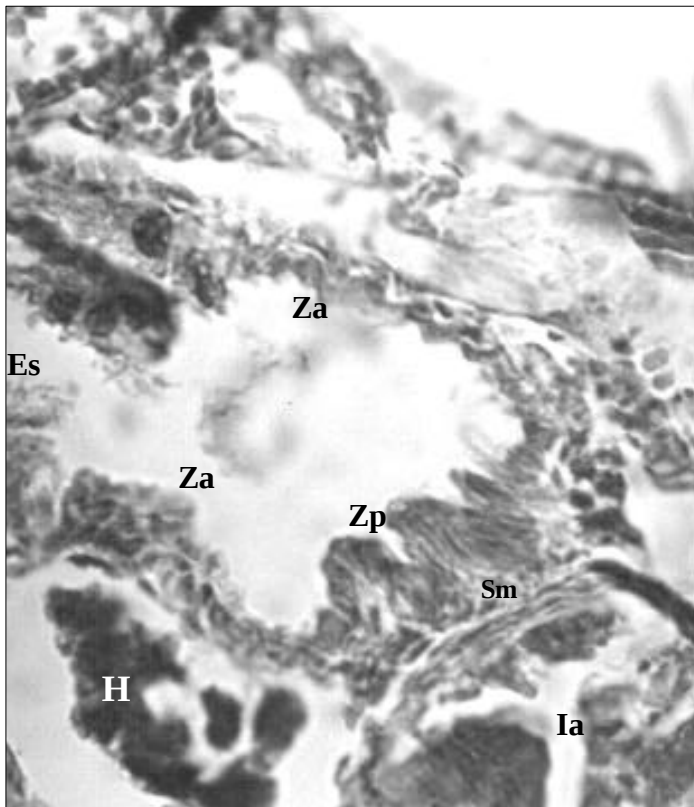
Et: Estómago

Ia: Intestino anterior

Ip: Intestino posterior

H: Hígado

Para el día 5, el estómago presenta una mucosa formada por un epitelio cilíndrico simple no ciliado en la zona posterior y un epitelio cúbico simple en la zona anterior (Fig. 26). En ninguna de las dos zonas se observa la presencia de células caliciformes. Es evidente un aumento considerable tanto en la cantidad, como en el tamaño de los pliegues de la mucosa, la submucosa presenta un mayor número de fibras de tejido conectivo.



←
Figura 26.- Larva de 5 días dde. Se observa un epitelio cilíndrico simple en la región posterior (Zp) y un epitelio cúbico simple en la región anterior (Za). PAS. 40x.

Es: Esófago

H: Hígado

Ia: Intestino anterior

Sm: Túnica submucosa

A partir del día 6 y hasta el día 9 dde, el estómago y el intestino anterior sufren una torsión (Fig. 27). El número de pliegues, así como la altura de los mismos en la mucosa gástrica, sigue aumentado considerablemente, presentando una orientación longitudinal con una trayectoria en zigzag (Fig. 28). En el día 10 se distinguen las dos capas musculares, aunque la longitudinal no es muy gruesa.

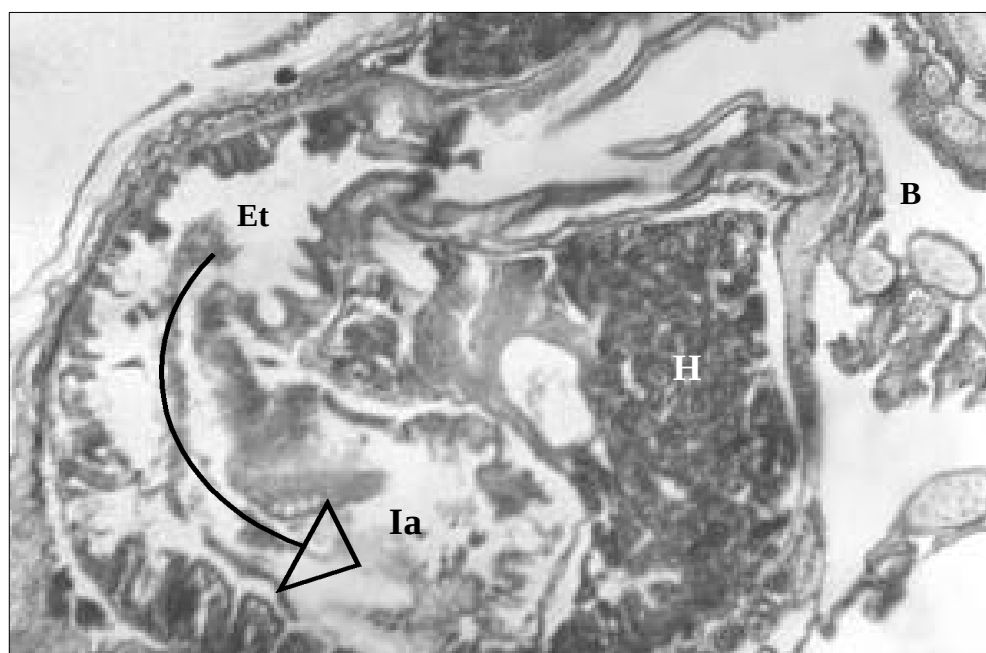


Figura 27.- Larva de 9 días dde. Torsión del tubo digestivo involucrando al estómago y al intestino anterior (→). H-E. 10x.

Ia: Intestino anterior
Et: Estómago

B: Bucofarine
H: Hígado

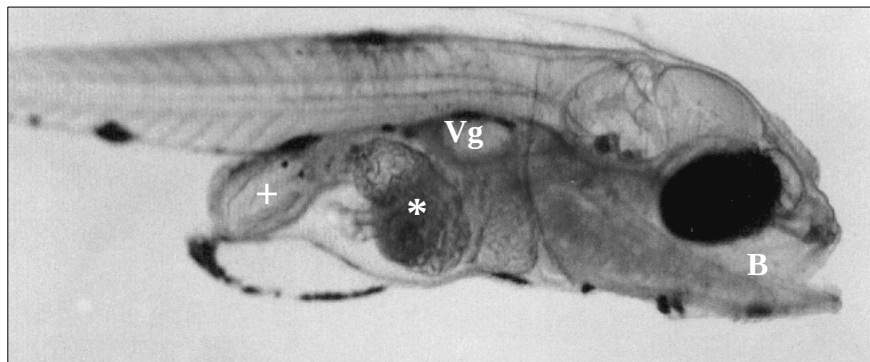
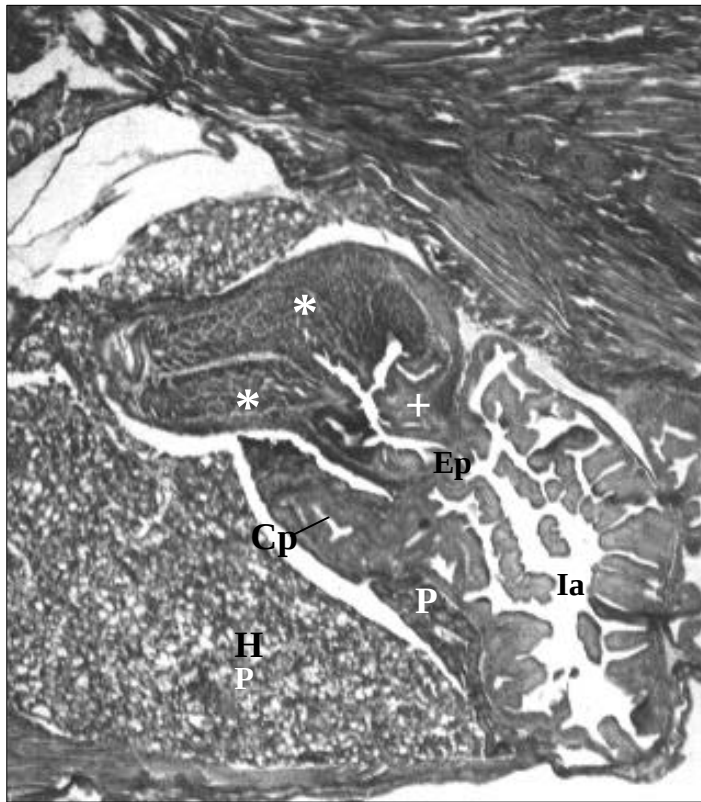


Figura 28.- Larva de 9 días dde. LT promedio = 3.9 ± 0.4 mm (n=40). Se observa la diferencia de pliegues entre el intestino anterior-estómago (*) y el intestino posterior (+). 3.2x.

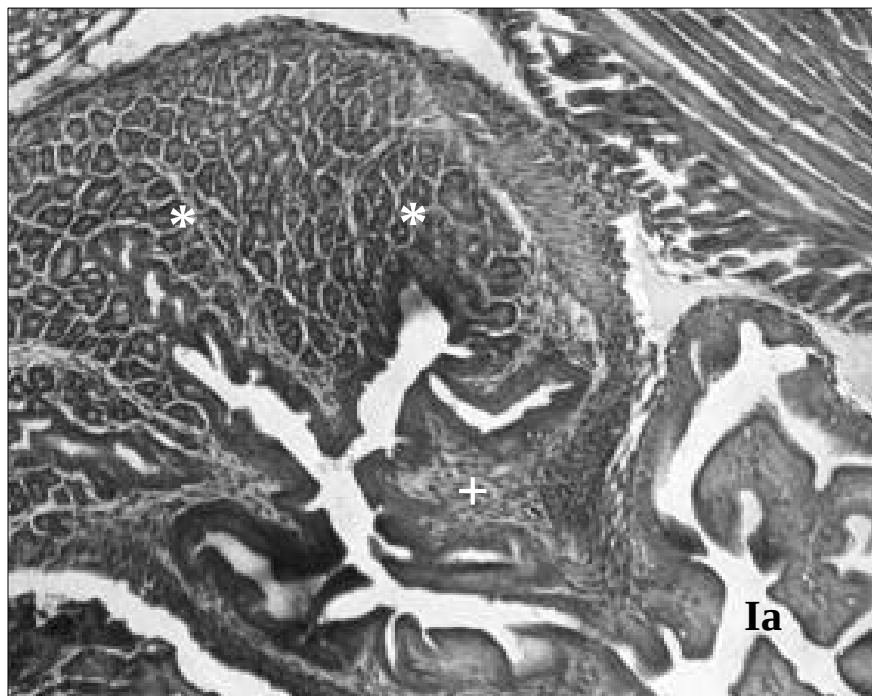
Vg: Vejiga gaseosa

B: Bucofaringe

A partir del día 16 dde, en los individuos más grandes (LT de 9.3 mm) se distinguen las primeras glándulas gástricas, revestidas por un epitelio cúbico simple. En el estómago, se observan dos regiones principales: una que presenta glándulas y otra que no (Fig. 29). La primera, se localiza en las regiones anterior-media del estómago, enseguida del esfínter esofágico, mientras que la segunda se ubica en la región posterior, justo antes del intestino anterior, por lo que se distingue el esfínter pilórico formado por epitelio cilíndrico no ciliado, tejido conectivo laxo areolar y numerosas fibras musculares (Fig. 30).



A)



B)

Figura 29.- Larva de 16 días dde. El estómago presenta dos regiones principales: una con glándulas (*) y otra sin glándulas (+). A) H-E. 10x; B) H-E. 40x.

H: Hígado

Ia: Intestino anterior

Cp: Ciego pilórico

P: Páncreas

Ep: Esfínter pilórico

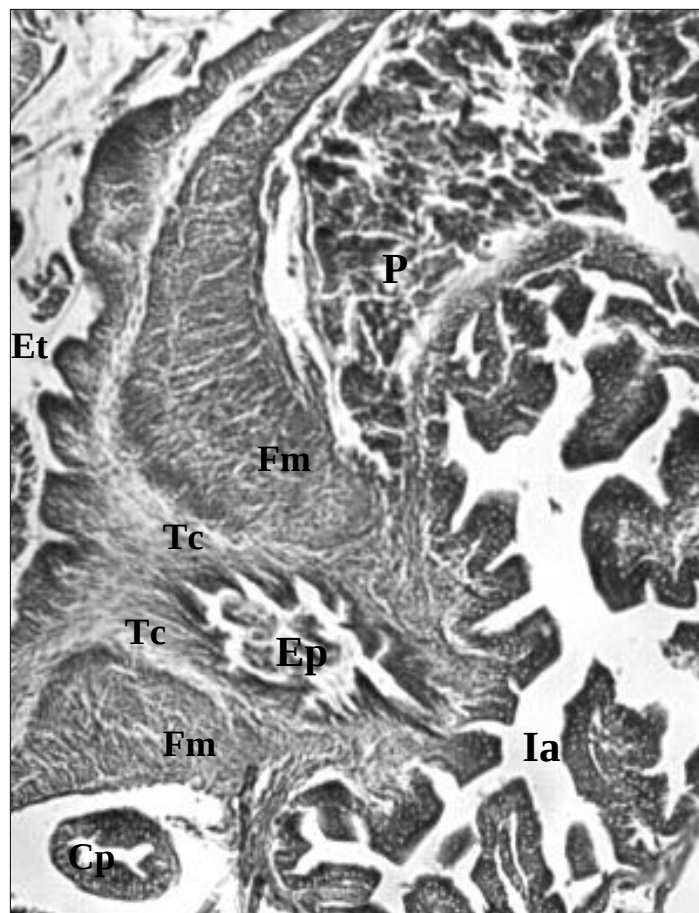


Figura 30.- Larva de 22 días dde. El esfínter pilórico (Ep), está compuesto por una gran cantidad de fibras musculares (Fm) y de fibras de tejido conectivo (Tc).H-E. 10x.

Et: Estómago

Ia: Intestino anterior

P: Páncreas

Cp: Ciego pilórico

Intestinos

Después de la eclosión, las regiones media y posterior del tubo digestivo están revestidas por un epitelio cúbico-cilíndrico en toda su longitud (Fig. 31). No se han desarrollado las tunicas submucosa y muscular, solamente es visible la mucosa apoyada sobre la lámina propia, que a su vez descansa sobre una delgada capa de tejido conectivo. El lumen no está muy desarrollado.

Al día 01 dde, el lumen es mayor en la región anterior que en la posterior (Fig. 32). Ocurre un ligero aumento en el grosor de la capa de tejido conectivo que cubre al tubo digestivo, el epitelio de la región dorsal cambia a un tipo cilíndrico simple, los enterocitos presentan un núcleo basal y ovalado, aparecen muy pocas fibras circulares de músculo liso, y se observan algunas fibras longitudinales de músculo estriado.

Para el día 02 dde, se forma la válvula intestinal conformada por tejido conectivo y epitelio cilíndrico simple, la cual permite distinguir el intestino anterior y el intestino posterior (Fig. 33). Por su parte, la región distal del intestino posterior, presenta un epitelio cilíndrico simple que se modifica en un tipo plano estratificado conforme se aproxima al ano, diferenciándose como el recto. En la mucosa de ambos intestinos, excepto en la del recto, se desarrollan una serie de pliegues (Fig. 34).

En el mismo día 2 dde, en los enterocitos de la mucosa de ambos intestinos inicia la formación del borde plumoso (Fig. 34), que está constituido por numerosas microvellosidades. Aumenta la cantidad de tejido conectivo debajo del epitelio, y aún persisten muy pocas fibras de músculo liso. En el intestino posterior, las microvellosidades son menos tanto en número como en cantidad hasta llegar al recto, el cual carece de borde plumoso. El número y tamaño de los pliegues de la mucosa aumentan con el desarrollo (Fig. 35).

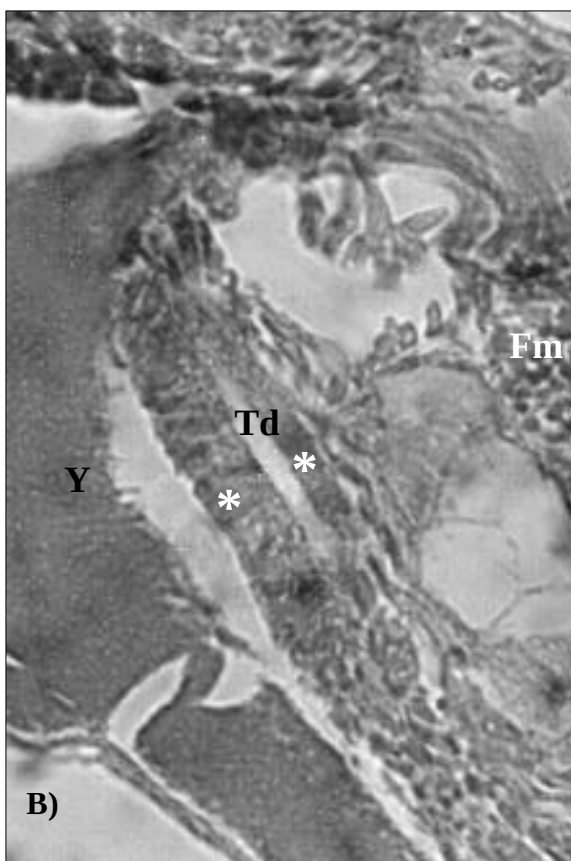
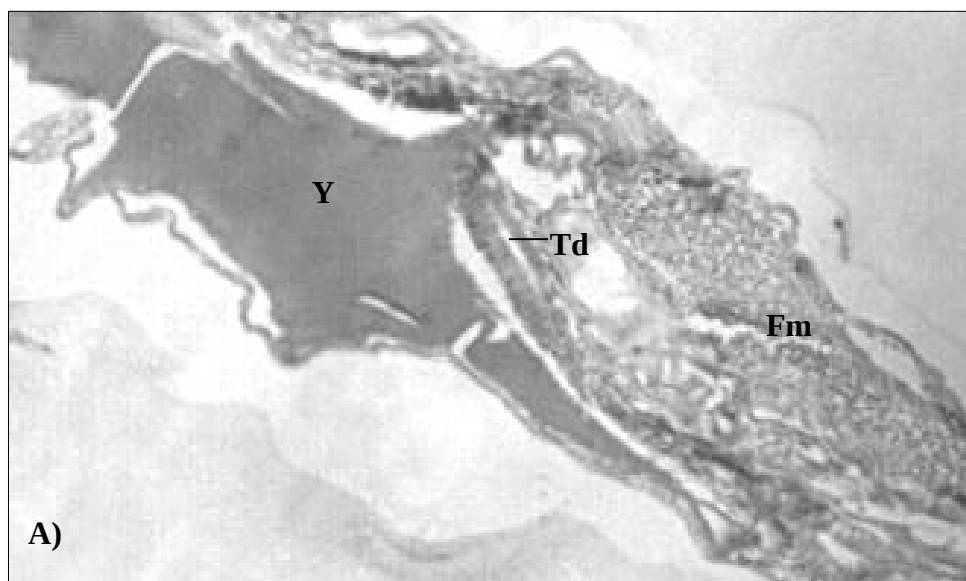


Figura 31.- Eleuteroembrión al momento de la eclosión (día 0). El tubo digestivo es un tubo recto indiferenciado constituido por un epitelio cúbico-cilíndrico simple (*). A) H-E. 10x; B) H-E. 40x.

Fm: Fibras musculares
Td: Tubo digestivo
Y: Saco vitelino

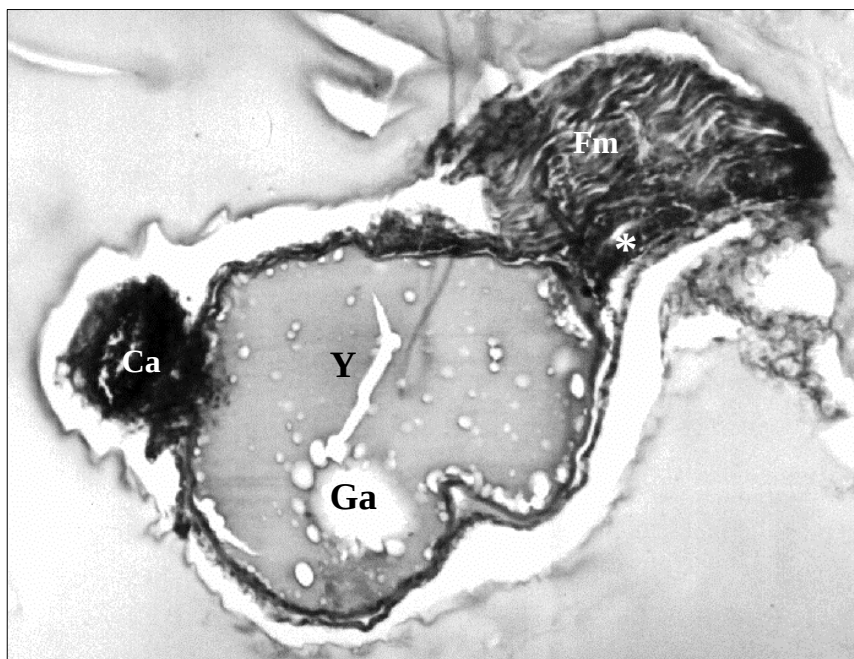


Figura 32.- Eleutheroembrión de 1 día dde. El lumen de la región anterior (*) presenta un mayor diámetro que en la región posterior. H-E. 10x.

Y: Saco vitelino

Fm: Fibras musculares

Ga: Glóbulo de aceite

Ca: Cabeza

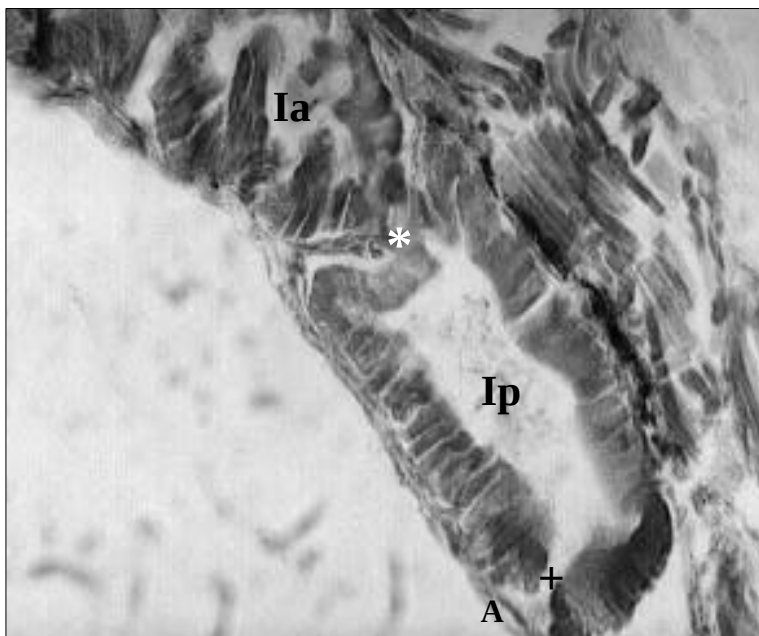


Figura 33.- Eleutheroembrión de 2 días dde. Válvula intestinal (*) que divide al intestino anterior del intestino posterior. Nótese el recto corto (+). H-E. 40x.

A: Ano

Ia: Intestino anterior

Ip: Intestino posterior

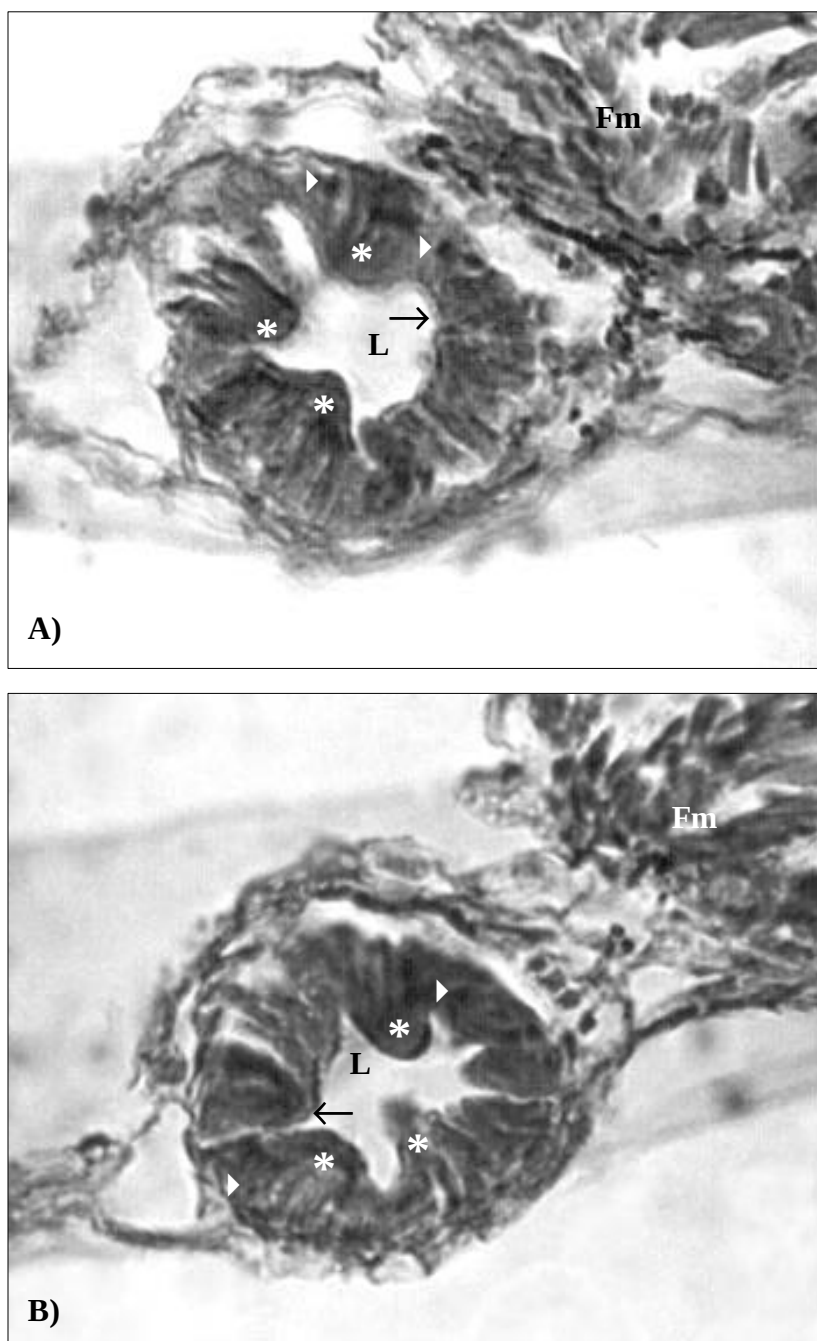


Figura 34.- Eleuteroembrión de 2 días dde. A) Intestino anterior con un lumen (L) más desarrollado. PAS. 40x. B) Intestino posterior con un lumen (L) menos desarrollado. PAS. 40x. Nótese el inicio de la formación de los pliegues de la mucosa (*) en ambos intestinos, así como el borde plumoso (→). Se distinguen varios puntos PAS positivos en ambos intestinos (▸).
Fm: Fibras musculares

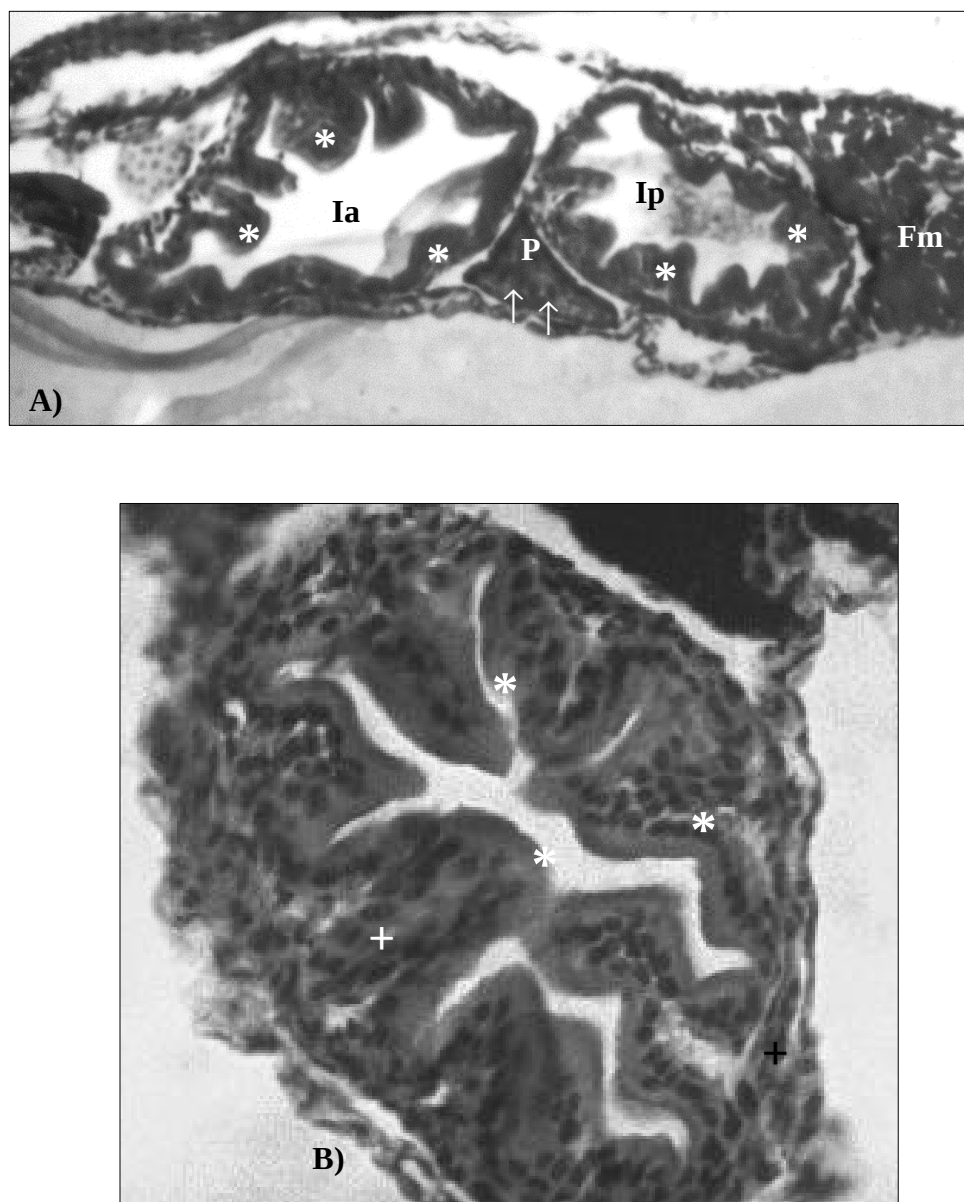
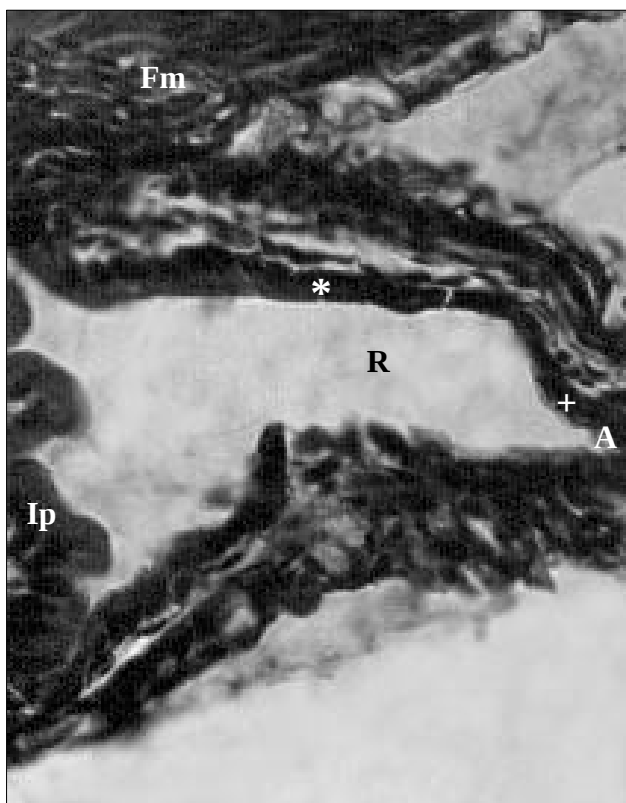


Figura 35.- Larva de 4 días dde. Los intestinos presentan numerosos pliegues de la mucosa (*). A) Corte longitudinal. Nótese el páncreas con gránulos de zimógeno (→). H-E. 10x. B) Corte transversal del intestino posterior. Nótese la túnica submucosa (+). H-E. 40x.

Ia: Intestino anterior
Fm: Fibras musculares

Ip: Intestino posterior
P: Páncreas

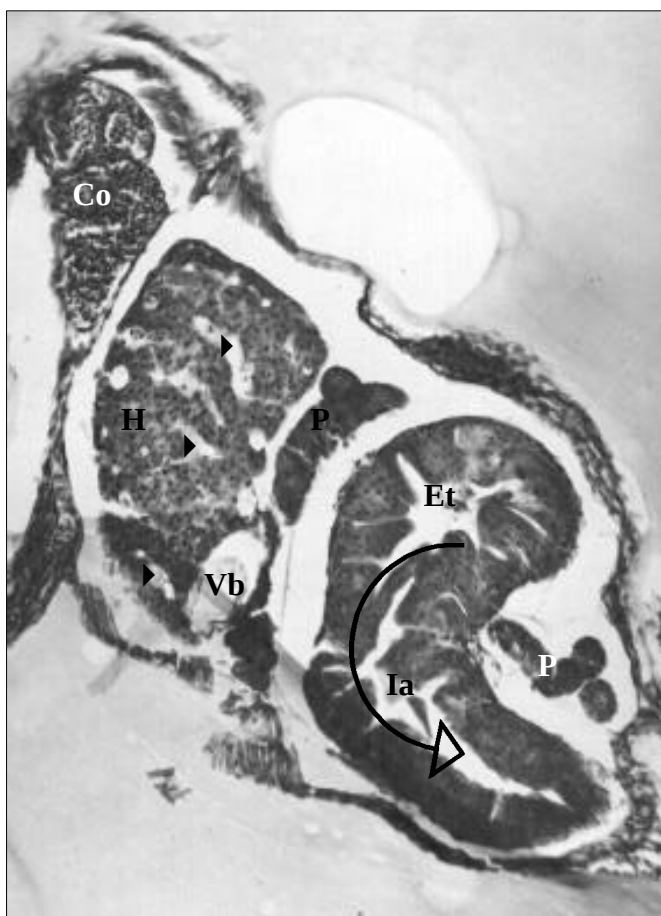
Para el día 5 dde, el intestino anterior está revestido por un epitelio cilíndrico simple ciliado con pocas células caliciformes intercaladas. El intestino posterior también presenta un epitelio cilíndrico simple ciliado y un menor número de células caliciformes. Por su parte, el recto no presenta células caliciformes durante todo su desarrollo (Fig. 36).



←
Figura 36.- Larva de 10 días dde. El epitelio en el recto (R) es cúbico simple (*), cambia a un tipo plano estratificado (+) conforme se aproxima al ano (A). No se observa la presencia de células caliciformes. H-E. 40x.

Ip: Intestino posterior
Fm: Fibras musculares

La torsión del tubo digestivo, que involucra al intestino anterior, inicia en el día 6 dde, y finaliza el día 9 (Fig. 37). El número de pliegues de la mucosa es considerablemente mayor. Los pliegues se orientan en dirección horizontal en ambos intestinos, sin embargo, en el intestino anterior siguen una trayectoria en zigzag, similar a la de los pliegues presentes en el estómago, mientras que en el intestino posterior la trayectoria es recta (Fig. 38).



←
Figura 37.- Larva de 6 días dde. Vista dorsal. Inicia el proceso de torsión del tubo digestivo. Nótese el estómago (Et) y el intestino anterior (Ia) en torsión (→). H-E. 10x.

Co: Corazón
H: Hígado. Nótese la presencia de sinusoides bien formados (▶).
P: Páncreas
Vb: Vesícula biliar

Las diferencias entre los pliegues intestinales, no sólo se presentan en la dirección y la trayectoria, sino que también en altura y forma. El intestino anterior presenta una forma digitiforme con mayor altura, mientras que el intestino posterior, tiene una forma fungiforme de menor altura (Fig. 38). Por su parte, en el recto no se desarrolla ningún tipo de pliegues (Fig. 36).

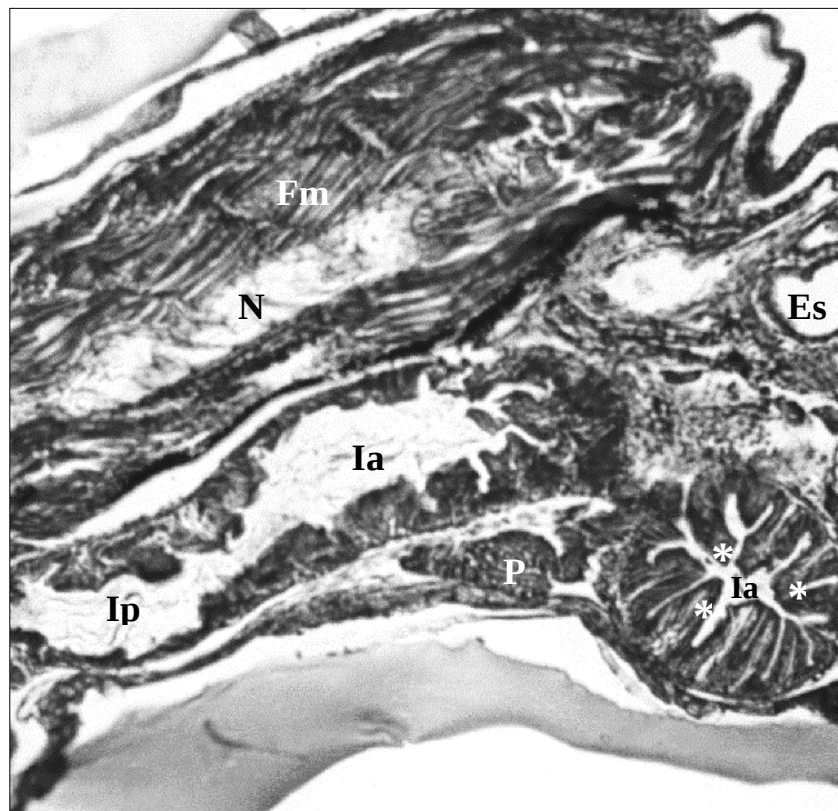


Figura 38.- Larva de 9 días dde. Ha finalizado la torsión del tubo digestivo. Nótese la altura de los pliegues de la mucosa (*) del intestino anterior (Ia), superior a los del intestino posterior (Ip). H-E. 10x.

Es: Esófago

N: Notocordio

Fm: Fibras msculares

P: Páncreas

Al día 10 dde, las cuatro tunicas están presentes en ambos intestinos y recto, pero no poseen su grosor final. Para el día 13, las tunicas de los intestinos están bien formadas e incluyen las dos musculares.

Para el día 16 dde, la LT promedio de las larvas es de 7.2 mm, sin embargo, en los individuos más grandes (9.3 mm), aparecen las primeras glándulas gástricas. El primer ciego pilórico está ubicado en la región proximal del intestino anterior, justo por detrás del esfínter pilórico. El ciego pilórico presenta la misma estructura histológica que el intestino anterior, salvo que el número de células caliciformes intercaladas entre los enterocitos es considerablemente menor al del intestino anterior (Fig. 29).

Para el día 20 dde, tanto los intestinos como el recto, desarrollan considerablemente las capas musculares. Para el día 22 dde, ya se observan cuatro ciegos pilóricos con la misma estructura, tres de ellos con el lumen bien formado y uno apenas en formación con el lumen en desarrollo (Fig. 39a). Los pliegues de la mucosa de ambos intestinos presentan una serie de micropliegues ó pliegues secundarios, los cuales son muy pequeños y se localizan en ambos costados de los pliegues primarios como pequeñas hendiduras entre los enterocitos (Fig. 39b).

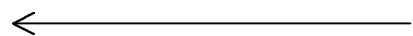
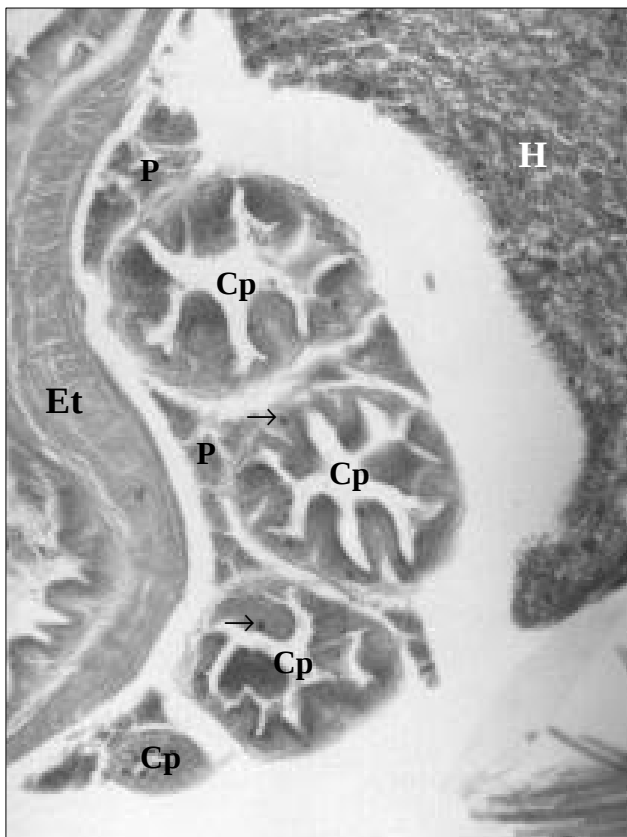


Figura 39a.- Larva de 22 días dde. Presencia de cuatro ciegos pilóricos (Cp). Nótese las células caliciformes (→) intercaladas en la túnica mucosa. PAS. 40x.

Et: Estómago

H: Hígado

P: Páncreas

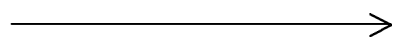
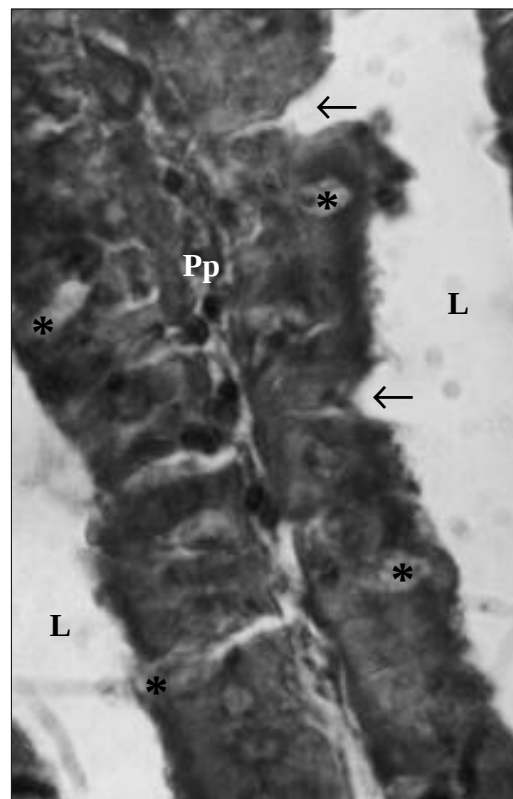


Figura 39b.- Larva de 22 días dde. Pliegue primario de la mucosa del intestino anterior. Nótese los pliegues secundarios (→) en la pared de los pliegues primarios (Pp) así como las células caliciformes (*). H-E. 100x

L: Lumen



Especializaciones del tubo digestivo

Vejiga Gaseosa

Al momento de la eclosión, la vejiga gaseosa no está presente. Para el día 5 dde inicia el proceso de inflación y se encuentra cubierta en la superficie superior por células pigmentarias (Fig. 8). Se encuentra revestida por un epitelio plano simple, el cual descansa en una serie de fibras conectivas y fibras de músculo liso. Para el día 9 dde, la vejiga gaseosa ya se encuentra bien formada (Fig. 14).

Organos anexos

Hígado

Al momento de la eclosión, el hígado se compone por un paquete de células sin orden aparente y rodeadas por una fina capa de tejido conectivo. Para el día 1 dde, el cambio fué mínimo, aumentando el número de hepatocitos, sin que se observaran conductos hepáticos. Al día 2, el número de hepatocitos aumenta (Fig. 40) y se distinguen dos conductos hepáticos (canales biliares), uno en cada extremo.

Para el día 5 dde, los hepatocitos presentan un arreglo en hileras alrededor de los conductos hepáticos, los cuales aumentan en número (Fig. 12). Para el día 6 dde, se distingue la vesícula biliar. Los hepatocitos se arreglan en cordones. Se observan numerosos sinusoides bien desarrollados a lo largo de su estructura (Fig. 37). A partir de ese momento, en el hígado aumentan el tamaño y el número de hepatocitos y conductos, de acuerdo al desarrollo de las larvas.

Páncreas

Por su parte, el páncreas se presenta en el día 1 como un parche celular, con un diámetro menor al tubo digestivo y repleto de células compactadas. Al día 2 se distinguen los primeros gránulos de zimógeno (Fig. 40). Para el día 3, el páncreas es compacto y se encuentra en posición dorsal del intestino anterior. Al día 5, el páncreas emigra hacia la zona ventral y proximal del intestino anterior.

Al día 6 dde, durante la torsión del tubo digestivo, cambia su forma y posición en el cuerpo de la larva, a una forma difusa y a una posición detrás del hígado y alrededor del estómago e intestino anterior (Fig. 37). A partir del día 10, se observa el conducto del páncreas exócrino, compuesto por un epitelio de transición (Fig. 41). Al día 13 se distinguen numerosos gránulos de zimógeno. Al momento de la aparición del primer ciego pilórico, éste se encuentra rodeado por el páncreas (Fig. 29), así como los siguientes ciegos pilóricos que se desarrollen (Fig. 39).

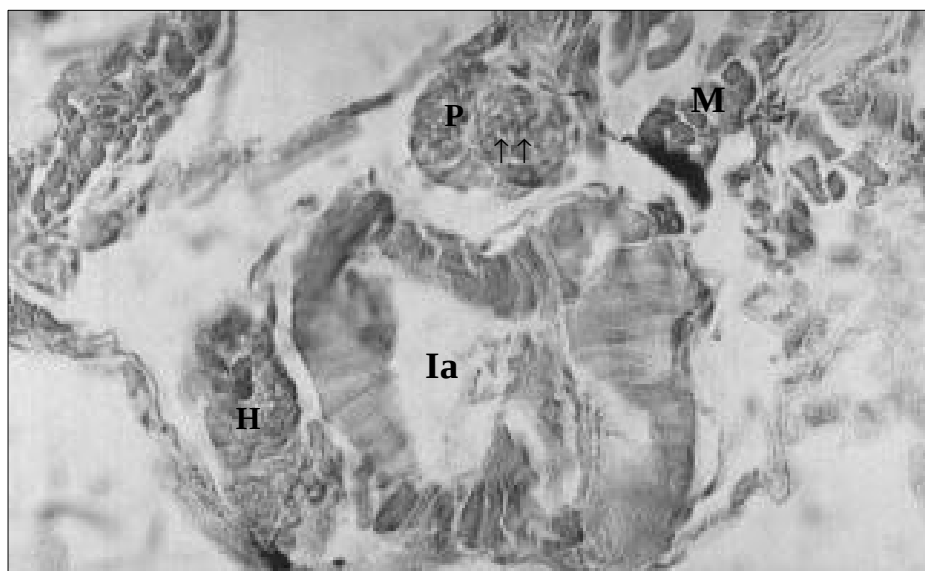


Figura 40.- Larva de 2 días dde. El hígado se encuentra por delante del intestino anterior, mientras que el páncreas se encuentra en posición dorsal. Nótese algunos gránulos de zimógeno (→) en el páncreas. H-E. 40x.

H: Hígado

Ia: Intestino anterior

P: Páncreas

M: Fibras musculares

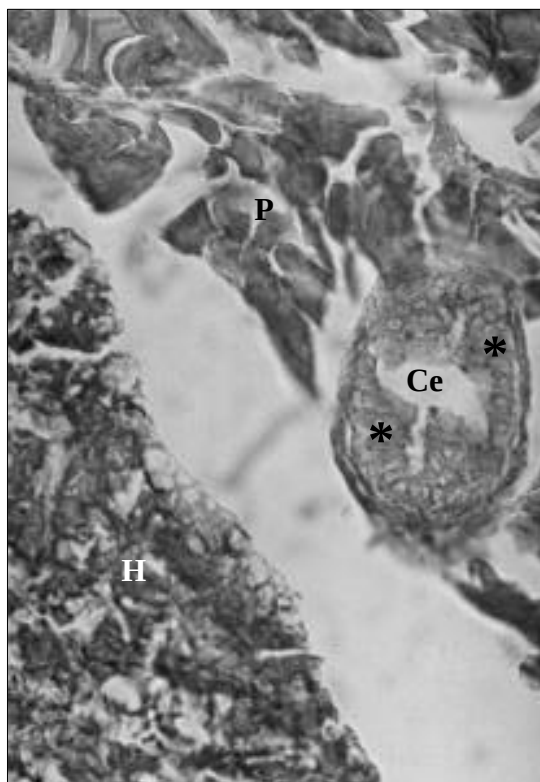


Figura 41.- Larva de 12 días dde. Conducto pancreático exócrino (Ce) compuesto por un epitelio de transición (*). H-E. 40x.

P: Páncreas

H: Hígado

DESARROLLO ESPECIFICO DE ORGANOS

Los órganos constituyentes del tubo digestivo (bucofaringe, esófago, estómago, intestino anterior, intestino posterior, recto, páncreas e hígado) están formados por componentes particulares que se conjuntan para realizar las funciones propias del tubo digestivo. Sin embargo, esa conjunción de los componentes particulares no se logra al mismo tiempo. La tabla 6 muestra los momentos de aparición tanto de cada uno de los órganos del tubo digestivo, así

Tabla 1.- Componentes del tubo digestivo, durante el desarrollo de *Paralabrax maculatofasciatus*.

[illegible]

HISTOQUIMICA DEL DESARROLLO DEL TUBO DIGESTIVO

Carbohidratos

Al momento de la eclosión, no se distingue ninguna reacción PAS positiva en todo el eleuteroembrión. En el día 1 dde, se presenta una ligera reacción PAS positiva en el saco vitelino, la cual desaparece al momento de que este fue absorbido. Al día 2, se observan muchas granulaciones positivas en el epitelio del intestino anterior (Fig. 34). Se presenta también una reacción positiva en el hígado, la cual permanece durante todo el desarrollo (Fig. 42).

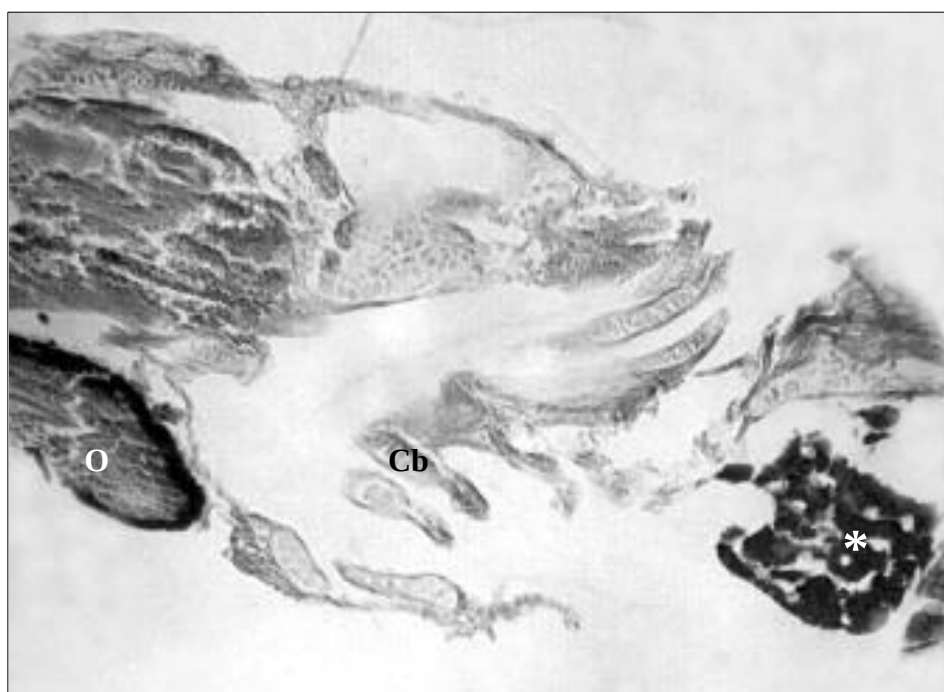
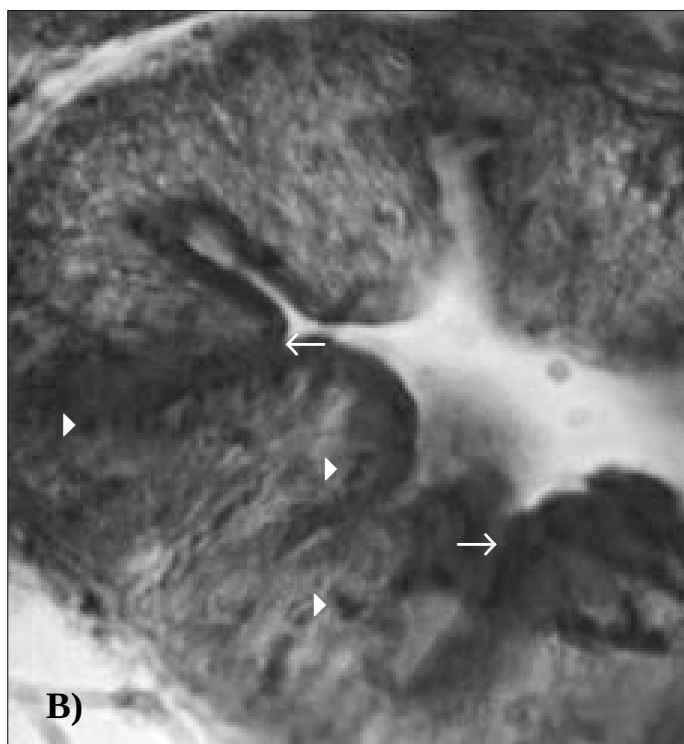
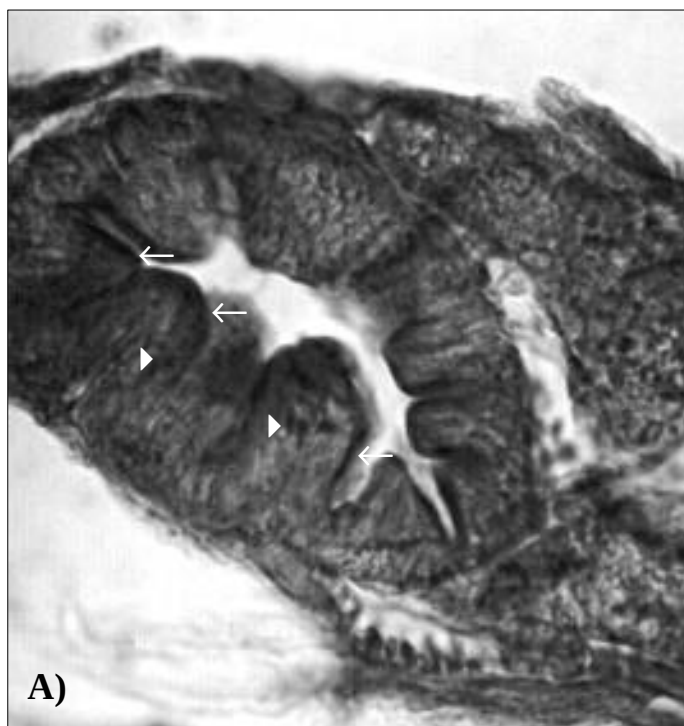


Figura 42.- Larva de 5 días dde. Hígado con una reacción positiva al ácido peryódico de Schiff (*). PAS. 10x.

O: ojo

Cb: Cartílagos branquiales

Desde el día 4 dde, se presenta una reacción positiva en el borde plumoso de ambos intestinos, y un aumento en el número de granulaciones PAS positivas en el citoplasma de los enterocitos de ambos intestinos (Fig. 43).



←

Figura 43.- Larva de 4 días dde. Reacción positiva al ácido peryódico de Schiff en el borde plumoso (←) de ambos intestinos, así como dentro de los enterocitos (▸). A) PAS. 10x; B) PAS. 100x.

A partir del día 6 dde, las células caliciformes presentes en la bucofaringe (Fig. 13) y en los intestinos (Fig. 44) dan una reacción positiva.

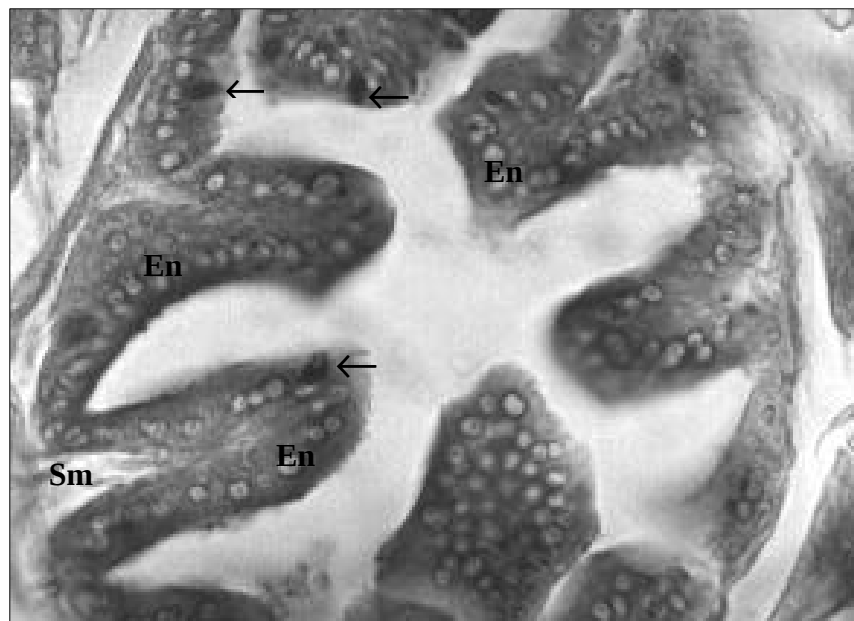


Figura 44.- Larva de 12 días dde. Células caliciformes de ambos intestinos con reacción positiva al ácido peryódico de Schiff (→). PAS. 40x.

En: Enterocitos

Sm: Submucosa

Durante los primeros días de desarrollo, el páncreas no presenta reacción positiva, sin embargo, a partir del día 5 dde, se observan gránulos positivos en los acinos pancreáticos (Fig. 45).

A partir del día 13 dde, el estómago presenta gránulos positivos, principalmente en la mucosa de la región anterior. A los 22 días, se observa una reacción positiva en algunas glándulas gástricas (Fig. 46).

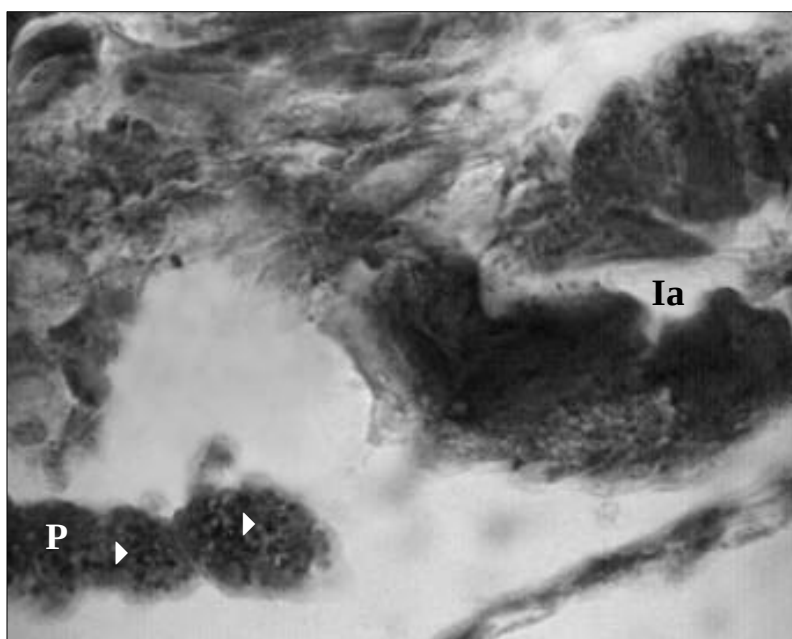


Figura 45.- Larva de 5 días dde. Acinos pancreáticos con gránulos positivos al ácido peryódico de Schiff (▸). PAS. 40x.

Ia: Intestino anterior

P: Páncreas



Figura 46.- Larva de 22 días dde. Glándulas gástricas (Gg) positivas al ácido peryódico de Schiff (→). Nótese que sólo las glándulas cercanas a la mucosa son positivas.PAS. 10x.

A: alimento

R: Riñón

La mucosa gástrica también presenta una reacción PAS positiva (Fig. 47). Durante todo el desarrollo no hubo una reacción positiva en el recto.

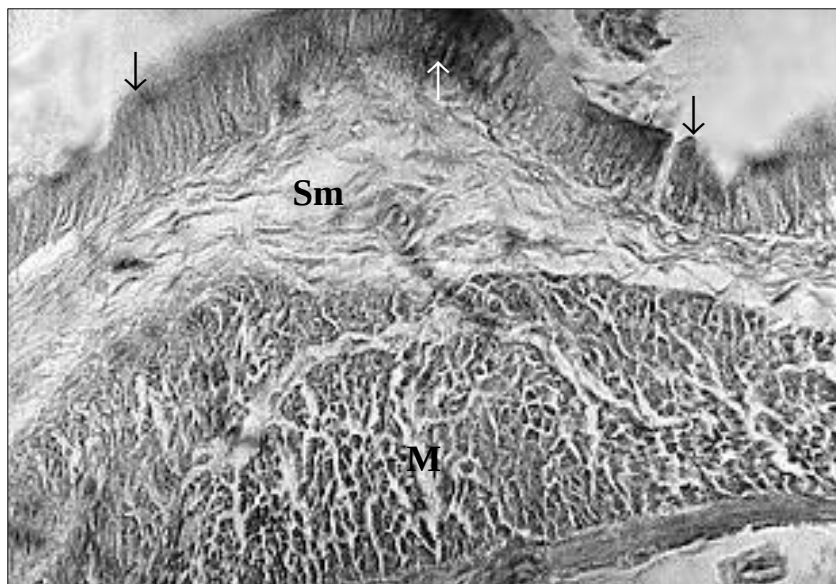


Figura 47.- Larva de 22 días. Reacción PAS positiva en la mucosa gástrica (→). Nótese el grosor de las túnicas submucosa (Sm) y muscular (M). PAS. 10x.

Proteínas

Cuatro días posteriores al inicio de la alimentación exógena, se distinguen en la región apical de los enterocitos de las regiones media y distal del intestino posterior, numerosas vesículas positivas a la reacción Ninhidrina-Schiff (Fig. 48). Se presentan también en la región anterior, pero en menor número. Se distribuyen principalmente en las regiones media y superior de los pliegues de la mucosa. Dichas vesículas aumentan de tamaño conforme la larva crece, hasta alcanzar un tamaño máximo para el día 16 dde (Fig. 49). Posteriormente, las vesículas disminuyen de tamaño, hasta que eventualmente desaparecen al día 24 dde.

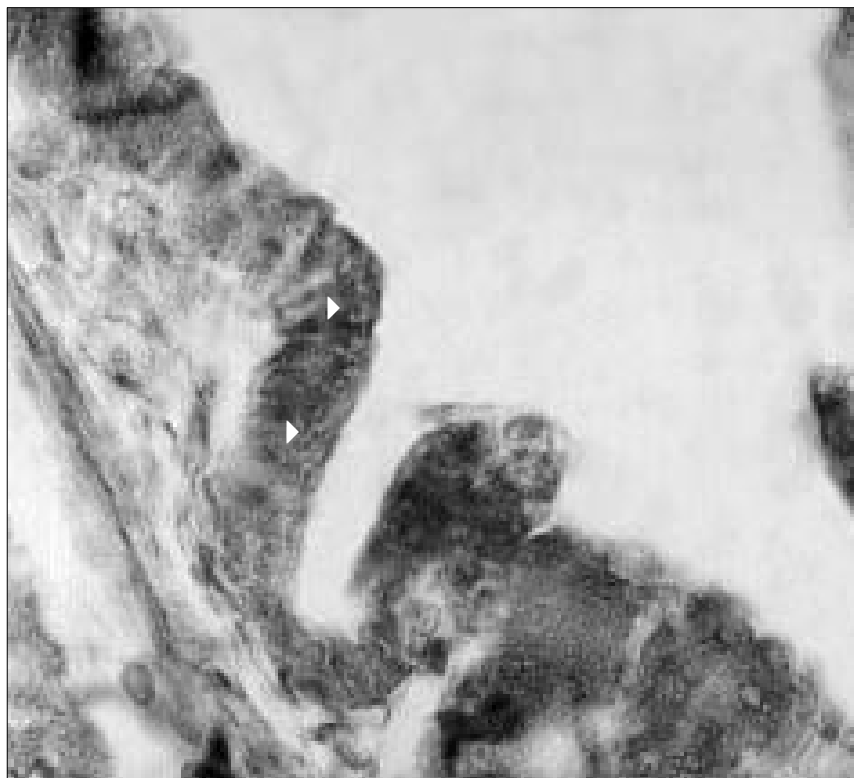


Figura 48.- Larva de 6 días dde. Vesículas positivas a la reacción de Ninhidrina-Schiff (►) en los enterocitos del intestino posterior. Nótese que las vesículas se distribuyen en la región apical de los enterocitos. N-S. 10x.

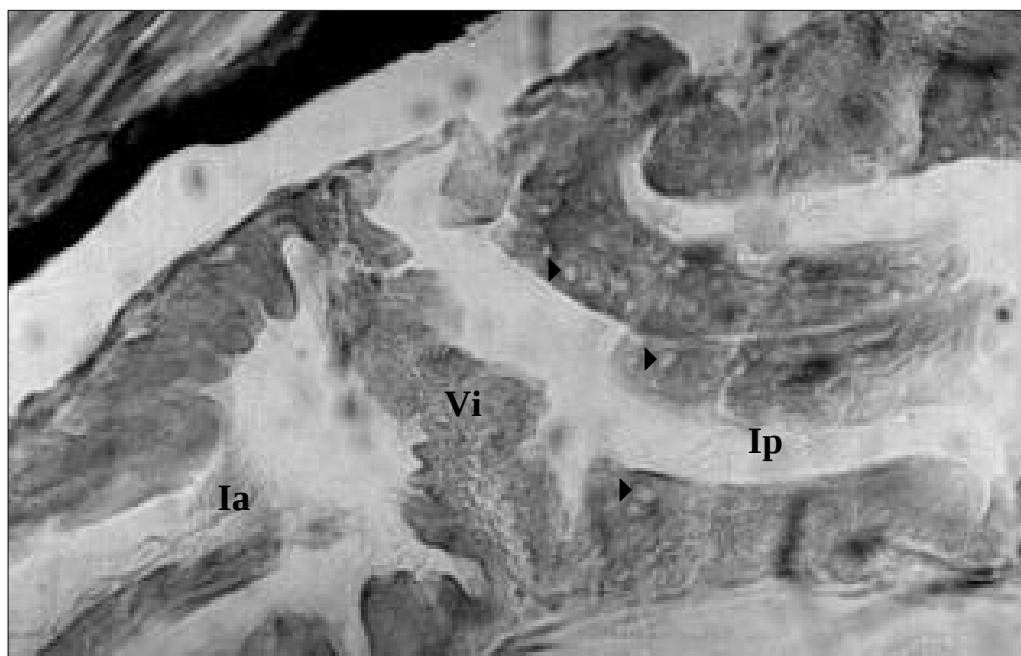


Figura 49.- Larva de 16 días dde. Vesículas positivas a la reacción de Ninhidrina-Schiff (►). Nótese el mayor tamaño de las vesículas comparadas con las de la figura 48. N-S. 10x.

Ia: Intestino anterior
Vi: Válvula intestinal

Ip: Intestino posterior

Lípidos

Cuatro días después de iniciada la alimentación exógena, dentro de los enterocitos del intestino anterior se distinguen numerosas vacuolas localizadas en la región supranuclear (Fig. 50). Se distribuyen en la región media del intestino anterior y principalmente en las células del borde superior de los pliegues de la mucosa. Estas vacuolas, aumentan considerablemente de tamaño durante el desarrollo, hasta que alcanzan un tamaño máximo para el día 16 (Fig. 51). Posteriormente, las vacuolas comienzan a disminuir en tamaño hasta casi desaparecer al día 22 dde.

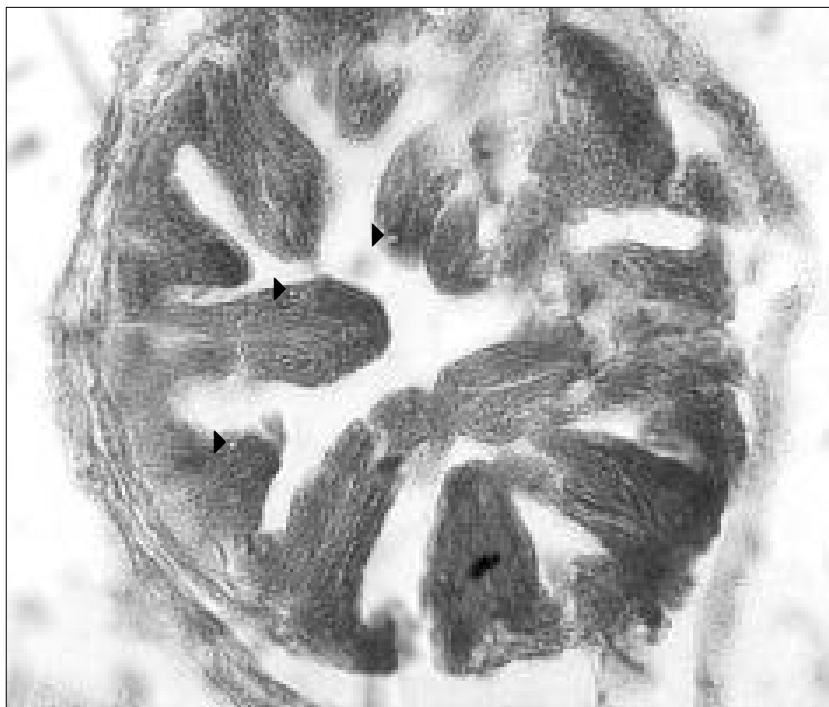


Figura 50.- Larva de 6 días dde. Primeras vacuolas digestivas en el intestino anterior (►). Nótese que se distribuyen principalmente en los bordes superiores de los pliegues de la mucosa. H-E. 10x.

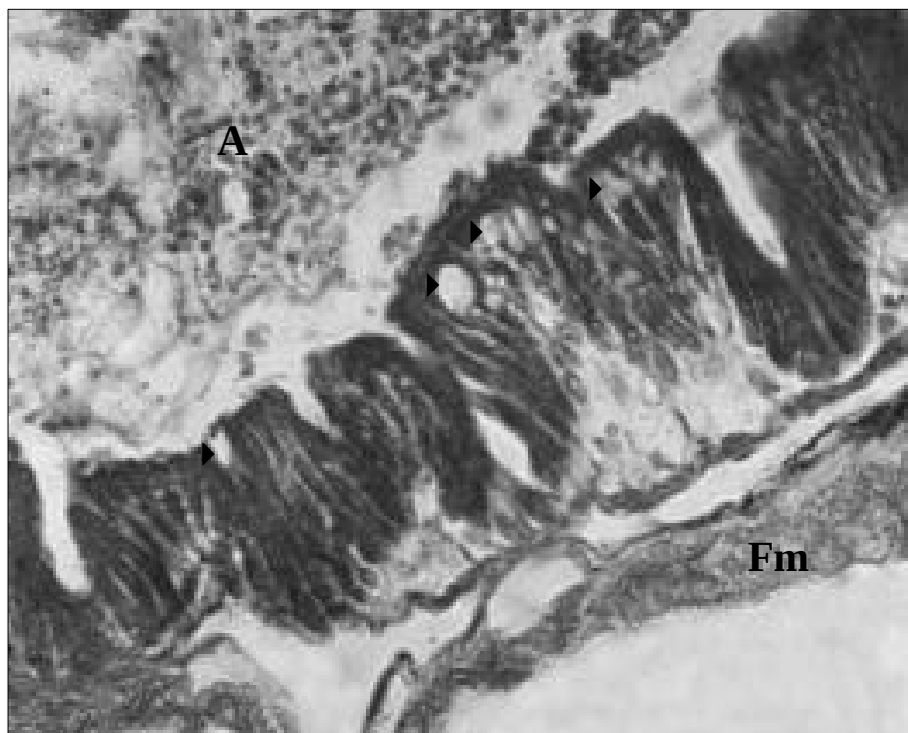


Figura 51.- Larva de 16 días. Vacuolas gástricas grandes presentes en el intestino anterior (►). Nótese que se distribuyen en el borde superior de los pliegues de la mucosa. H-E. 40x.

A: Alimento

Fm: Fibras musculares

La tabla 2 muestra los tiempos de aparición y duración de la absorción de proteínas, lípidos y carbohidratos.

Tabla 2.- Aparición de la absorción de carbohidratos, lípidos y proteínas en los componentes del tubo digestivo de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*.

Eleuteroembrión		Larva																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
Componente / Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	16	18	20	22	24	26	28	30																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
Bucofaringe																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
Céls. Caliciformes																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							</

IV

DISCUSION

Las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus* requieren de dos días para alcanzar la diferenciación morfológica mínima necesaria, que les permita iniciar con la obtención y absorción de alimento exógeno, aún cuando no se han agotado las reservas vitelinas. Esto significa, que durante los primeros días después de la eclosión, ocurren cambios significativos en la estructura del tubo digestivo, que sentarán las bases para el pleno funcionamiento de la fisiología digestiva de las larvas (Tanaka, 1971; 1973; Grizzle y Curd, 1978; Stroband y Dabrowski, 1979).

Al momento de la eclosión, el tubo digestivo de las larvas de la cabrilla arenera es un tubo recto indiferenciado, al igual que en otras especies (Iwai, 1967; Iwai y Tanaka, 1968; Grizzle y Curd, 1978; Beccaria *et al.*, 1991; Kjørsvik *et al.*, 1991; Boulhic y Gabaudan, 1992; Pedersen y Falk-Petersen, 1992; Bisbal y Bengtson, 1995; Guyot *et al.*, 1995; Sarasquete *et al.*, 1995; Morrison *et al.*, 1997; Calzada *et al.*, 1998; Segner y Rösch, 1998; Porter y Theilacker, 1999). La boca y el ano están cerrados, y el hígado y el páncreas no se observan sino hasta el día 1 dde.

Para el día 2 dde, ocurre una diferenciación inicial en el tubo digestivo de las larvas de la cabrilla arenera que consiste en la apertura de la boca y el ano, la formación de una válvula intestinal que permite dividir al intestino anterior del intestino posterior, la formación de microvellosidades (borde plumoso) en los enterocitos de ambos intestinos, la formación de pliegues de la mucosa y, el desarrollo del hígado y del páncreas.

De manera simultánea con la diferenciación inicial del tubo digestivo, se observa que en las larvas de *P. maculatofasciatus* los ojos se pigmentan. Tanaka (1973) y Segner (1996) sugieren una relación funcional entre el tubo digestivo y los elementos de los sentidos, de tal manera que las larvas sean capaces de localizar, seleccionar y obtener presas más grandes y móviles. Recientemente, Porter y Theilacker (1999) y Roo *et al.* (1999) demostraron la relación que existe entre el sistema visual y el tubo digestivo de las larvas *Theragra chalcogramma* y *Pagrus pagrus*, respectivamente.

Durante los primeros días de desarrollo, la fuente de alimentación endógena está conformada por el saco vitelino extraembrionario. La absorción del saco vitelino se realiza mediante endocitosis a través de un sincitio que lo rodea (Heming y Buddington, 1988; Watanabe y Kiron, 1994). Se ha observado que el tiempo en completarse la diferenciación inicial está en función de la cantidad y por ende, de la duración del saco vitelino (Tanaka 1973; Dabrowski, 1984).

En especies como *Sparus aurata* y *Paralichthys dentatus* la diferenciación inicial ocurre en tres días (Calzada, 1996; Bisbal y Begtson, 1995), mientras que en *Clarias gariepinus* (Verreth *et al.*, 1992) y *Chaenogobius annularis* (Watanabe y Sawada, 1985), al igual que en la cabrilla arenera, ocurre en dos días. Estas especies eclosionan con poco grado de desarrollo del tubo digestivo. En otros grupos como los salmónidos y los peces de agua dulce, los embriones emergen con un tubo digestivo muy desarrollado y con gran cantidad de vitelo, de tal forma que cuando se agotan las reservas vitelinas, el tubo digestivo está completamente desarrollado (Tanaka, 1973; Dabrowski, 1984).

Esta disparidad en el tiempo de diferenciación inicial del tubo digestivo, influye directamente en el tipo de alimento a suministrarse en la primera alimentación durante el cultivo de cualquier especie. En el cultivo larval de la cabrilla arenera, al momento de la primera alimentación, las larvas son

alimentadas con alimento vivo, al igual que muchas otras especies de peces marinos (Holt, 1993; Sorgeloos, 1994; Bisbal y Bengtson, 1995; Sarasquete *et al.*, 1995; Calzada, 1996; Rosenlund *et al.*, 1997). Una de las principales premisas del cultivo larvario en peces marinos es lograr el destete de las larvas lo antes posible.

Salvo algunas excepciones (Cahu *et al.*, 1998), el grado de diferenciación inicial que presentan estas larvas al momento de la primera alimentación, no hace posible que se digiera satisfactoriamente una dieta artificial (Dabrowski, 1984), lo cual se traduce, cuando se intenta el destete temprano, en un pobre crecimiento y altas tasas de mortalidad obtenidas con otras especies (Fyhn, 1989). Es por ello, que los experimentos de destete de larvas de peces marinos se realizan con larvas de mayor edad, en las cuales, es posible obtener mayores tasas de crecimiento y supervivencia (Person-Le Ruyet *et al.*, 1993; Cahu y Zambonino-Infante, 1997). No así con las larvas de peces de agua dulce y con los salmónidos, en los que se ha demostrado que es posible lograr el cultivo de manera intensiva con una dieta artificial desde el momento de la primera alimentación (Stroband y Dabrowski, 1979; Dabrowski, 1984; Segner *et al.*, 1988).

Sin embargo, aún en los peces de agua dulce, la digestión más eficiente del alimento y la mayor tasa de crecimiento se logran en las larvas alimentadas con presas vivas (Segner *et al.*, 1988; Rösch y Segner, 1990).

El problema de la asimilación de las dietas artificiales, al momento de la primera alimentación en las larvas de peces marinos, no está en función de la capacidad funcional de los elementos que intervienen directamente en la absorción de alimento (i. e. enterocitos del intestino anterior e intestino posterior), ya que se ha observado, al igual que en este trabajo, que los enterocitos en ambos intestinos han desarrollado un borde plumoso al momento de la primera alimentación (Watanabe y Sawada, 1985; Loewe y Eckmann, 1988; Calzada, 1996), el cual está directamente involucrado en la absorción del alimento (Iwai, 1967; Tanaka, 1971; Stroband y Dabrowski, 1979; Stroband y Kroon, 1981;

Watanabe, 1982a; 1984b; Morrison *et al.*, 1997). Algunos autores, consideran que más bien se trata de una falta o insuficiencia de la actividad enzimática en el momento de la primera alimentación (Lauff y Hofer, 1984, Munilla-Moran *et al.*, 1990; Boulhic y Gabaundán, 1992).

Sin embargo, existe evidencia de que la actividad enzimática en el tubo digestivo aparece aún antes de la primera alimentación y que se va incrementando con el desarrollo de la larva (Govoni *et al.*, 1986; Segner, 1996; Aguilera-González, 1999; Lazo, 1999). En este sentido, Stroband *et al.* (1979), Govoni *et al.* (1986), Calzada (1996) encontraron que en el borde plumoso de los intestinos anterior y posterior de diferentes especies se presenta actividad de las fosfatasas alcalina y ácida desde el momento de la primera alimentación con alimento vivo. Más aún, recientemente, Lazo (1999) describió que cuando las larvas de *Sciaenops ocellatus* se les ofrece como primera alimentación alimento vivo y una mezcla de alimento vivo-dieta microparticulada, no existe diferencia de la actividad de amilasa, tripsina y lipasa durante los primeros días del desarrollo. Sin embargo, a partir del día 14 para la lipasa, del día 18 para la amilasa y del día 22 para la tripsina, ocurre un incremento de la actividad enzimática en las larvas sometidas a la mezcla de alimento.

Al respecto, Mendoza-Alfaro (1994) atribuye el incremento de la actividad enzimática a la baja digestibilidad de algunos componentes de la dieta artificial. También se sabe que el páncreas, como se ha observado en la cabrilla, es un órgano que alcanza un alto grado de desarrollo durante los primeros días de desarrollo (Tanaka, 1969; Grizzle y Curd, 1978; Stroband y Dabrowski, 1979; Govoni *et al.*, 1986; Segner y Rösch, 1998), siendo capaz de producir enzimas digestivas, desde los primeros días después de la eclosión (Bisbal y Bengtson, 1995; Sarasquete *et al.*, 1995; Calzada, 1996; Kurokawa y Suzuki, 1996; Calzada *et al.*, 1998). De lo anterior, resalta que no es la ausencia de la actividad enzimática la causante del poco éxito obtenido durante el destete temprano de las larvas de peces marinos con dietas artificiales (Segner, 1996; Cahu y Zambonino-

Infante, 1997; Lazo, 1999; Ruiz-Treviño, 2000). Segner (1996), al respecto, menciona que podría tratarse de que en las dietas artificiales no existe un estimulante que catalice la liberación de las enzimas digestivas, mientras que Cahu y Zambonino-Infante (1997) señalan que se debe a que las dietas artificiales no cubren las necesidades nutritivas de las larvas.

En el caso particular de las larvas de la cabrilla arenera, es importante hacer notar, que al momento de la primera alimentación el tubo digestivo ya cuenta con estructuras morfológicas que permitirán el desarrollo de un mecanismo de digestión y absorción del alimento. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el estado de desarrollo morfológico de las estructuras digestivas, no siempre conlleva una capacidad fisiológica bien desarrollada. Con el objeto de esclarecer con mayor precisión el estado de la capacidad fisiológica del tubo digestivo en la primera alimentación, es necesario realizar estudios que permitan establecer el momento y el sitio iniciales de la actividad enzimática.

El alimento exógeno ingerido por las larvas de *P. maculatofasciatus* al momento de la primera alimentación, pasa por la bucofaringe y entra directamente al intestino anterior, ya que aún no se ha desarrollado el estómago, posteriormente atraviesa la válvula intestinal hasta llegar al intestino posterior y finalmente pasa por el recto y el ano justo antes de ser evacuado. Kapoor *et al.* (1975), Fänge y Grove (1979), Govoni *et al.* (1986) mencionaron que el tiempo de permanencia del alimento en el tubo digestivo de larvas de peces, es menor que en el de los juveniles y adultos, lo cual implica que los mecanismos de retención del alimento, así como los de digestión y absorción del mismo, también difieren entre los periodos del ciclo de vida de las especies (Govoni *et al.*, 1986).

En numerosas especies de peces, así como en el caso de la cabrilla arenera, los pliegues de la mucosa que aparecieron en los primeros días del desarrollo, aumentan tanto en número y tamaño, lo que permite incrementar la superficie de absorción, así como prolongar el tiempo de permanencia del

alimento en el tubo digestivo. En este sentido, a partir del momento en que inicia su formación en la parte media del tubo digestivo en las larvas de la cabrilla arenera al día 3 dde, el estómago, aún cuando no se encuentre totalmente desarrollado y por consiguiente no funcional, permite que el alimento ingerido por las larvas permanezca almacenado en él durante un corto período de tiempo, con lo cual se logra una mejor digestión que podrá traducirse en una mayor absorción de nutrientes provenientes del alimento. Esto está de acuerdo, con lo registrado por otros autores para otras especies (Hofer, 1985; Watanabe y Sawada, 1985; Loewe y Eckmann, 1988; Segner y Rösch, 1998).

A los 6 días dde, ocurre una torsión del tubo digestivo en las larvas de la cabrilla arenera, que involucra al estómago y al intestino anterior. Dicha torsión, permite un aprovechamiento del espacio en la cavidad visceral, así como prolongar el tiempo de permanencia del alimento en el tubo digestivo, de tal manera que sea aprovechado al máximo. Al finalizar la torsión del tubo digestivo en el día 9 dde, los pliegues de la mucosa presentan un arreglo diferencial de acuerdo a la región del tubo digestivo donde se presenten, un arreglo en zigzag en el estómago e intestino anterior y un arreglo recto en el intestino posterior.

Los primeros indicios de la absorción del alimento por parte del tubo digestivo de las larvas de *P. maculatofasciatus*, ocurren dos días después de haber iniciado la alimentación exógena. A partir de los 4 días dde, se observa una reacción PAS positiva en el hígado, la cual se considera como una señal inequívoca de la funcionalidad de los hepatocitos (Boulhic y Gabaudan, 1992) al iniciar con la acumulación de glucógeno. Al igual que en el presente trabajo, Blaxter (1969) y Tanaka (1973) encontraron en diferentes especies, que la acumulación de glucógeno comienza con el inicio de la alimentación y se mantiene permanentemente a través del periodo juvenil.

En las larvas de la cabrilla arenera, el borde plumoso de los intestinos, así como numerosas granulaciones en los enterocitos de los intestinos, sobretudo en

el intestino anterior, son PAS positivos. Por su parte, Tanaka (1973) encontró que las granulaciones presentes en los enterocitos de varias especies, corresponden a glucógeno. Sin embargo, no observó la pinocitosis de glucógeno en los intestinos, por lo que descartó que fuera absorbido directamente, previamente, Tanaka *et al.* (1972) reportaron la actividad de la amilasa en el páncreas de larvas y juveniles de *Plecoglossus altivelis*. Rösch y Segner (1990) utilizaron dietas artificiales y reportaron la actividad de la amilasa en el borde plumoso de los enterocitos del intestino de larvas de *Coregonus lavaretus*, y encontraron que la actividad aumenta con el desarrollo y puede ser inducida por la naturaleza de la dieta suministrada. Esto indica, que por un lado, las larvas de peces tienen la capacidad de digerir carbohidratos complejos temprano en el desarrollo (Segner, 1996), y por otro lado, que la glucogénesis ocurre en los enterocitos después de una digestión extracelular de oligosacáridos y polisacáridos a pentosas y hexosas (Kapoor *et al.*, 1975; Fänge y Grove, 1979; Watanabe, 1988).

Govoni *et al.* (1986) mencionaron que los mecanismos de absorción de carbohidratos en las larvas de peces no se conocen, mientras que en los adultos, Fänge y Grove (1979) mencionaron que la absorción de glucosa por el epitelio intestinal se lleva a cabo por un mecanismo activo y que puede ocurrir contra gradientes de concentración. En el caso de las larvas de la cabrilla arenosa, es indudable que la absorción de carbohidratos ocurre poco después de iniciada la alimentación exógena, así como el almacenamiento de glucógeno en el hígado. Sin embargo, es necesario establecer el momento y el lugar en donde inicia la actividad enzimática de la amilasa para poder comprender el mecanismo de absorción de los carbohidratos.

A los cuatro días después de iniciada la alimentación exógena con alimento vivo de las larvas de *P. maculatofasciatus*, se observaron numerosas vacuolas ubicadas en la región supranuclear de los enterocitos del intestino anterior. La presencia de vacuolas supranucleares es la evidencia de la absorción y acumulación de lípidos en el intestino anterior de la cabrilla arenosa, lo cual está

de acuerdo con lo encontrado en larvas (Iwai y Tanaka, 1968; Tanaka, 1973; Kapoor *et al.*, 1975; Watanabe y Sawada, 1985; Govoni *et al.*, 1986; Loewe y Eckmann, 1988; Kjorsvik *et al.*, 1991; Verreth *et al.*, 1992; Sarasquete *et al.*, 1995; Calzada *et al.*, 1998; Segner y Rösch, 1998; Porter y Theilacker, 1999), juveniles y adultos (Stroband, 1977; Fänge y Grove, 1979; Stroband y Dabrowski, 1979; Stroband y Kroon, 1981; Stroband y van Der Veen, 1981) de diferentes especies. Aún cuando se presenten en posición infranuclear (Sarasquete *et al.*, 1996).

Se ha observado, que el sitio de absorción de lípidos varía entre las especies, sobretodo si se trata de especies que presentan un tubo digestivo recto o con un giro. En las especies del primer grupo, los lípidos se absorben principalmente en la zona distal del intestino (Stroband y van Der Veen, 1981; Segner, 1996). En las especies del segundo grupo, como es el caso de la cabrilla arenera, el alimento se almacena temporalmente en el estómago y en el giro del intestino anterior, por lo que los lípidos se absorben en las zonas proximal y media del intestino anterior, este proceso se ha observado en larvas de diferentes especies (Tanaka, 1972a, Tanaka, 1973; Stroband y Dabrowski, 1979; Rösch y Segner, 1990; Kjorsvik *et al.*, 1991; Calzada, 1996). Igualmente, el proceso de absorción de lípidos ocurre en los ciegos pilóricos y el intestino anterior (Phillips, 1969; Kapoor *et al.*, 1975; Sargent *et al.*, 1989), ya que junto con el páncreas (Leger, 1985) y la mucosa intestinal, son unas de las fuentes de lipasa (Kjorsvik *et al.*, 1991).

No obstante, existen dos teorías acerca de los mecanismos de absorción de los lípidos, la primera postula que son absorbidos después de ser digeridos en ácidos grasos y glicerol, mientras que la otra sostiene que son absorbidos de manera intacta mediante pinocitosis (Tanaka, 1973). Sin embargo, no se ha registrado la presencia de vesículas pinocitóticas en el intestino anterior (Stroband y Dabrowski, 1979; Calzada, 1996). Más aún, se sabe que el hígado y el páncreas, en los teleósteos, se forman antes de que inicie la alimentación, y el páncreas comienza a formar y secretar gránulos de zimógeno uno o dos días

antes del inicio de la alimentación (Grizzle y Curd, 1978; Stroband y Dabrowski, 1979; Govoni *et al.*, 1986; Cousin *et al.*, 1987; Segner *et al.*, 1989; Bisbal y Bengtson, 1995; Guyot *et al.* 1995; Kurokawa y Suzuki 1996; Calzada, 1996; Calzada *et al.*, 1998; Segner y Rösch, 1998), esto sugiere que varios tipos de enzimas como la lipasa sean sintetizadas previo a la alimentación. Bajo este marco, es muy probable que en la cabrilla arenera la lipasa es sintetizada por el páncreas e hígado, permitiendo la absorción de lípidos por parte del intestino.

El tiempo de aparición de las vacuolas lipídicas desde el inicio de la alimentación exógena, varía entre las especies, en la cabrilla arenera aparecen cuatro días después. Verreth *et al.* (1992) trabajando con *Clarias gariepinus* observaron lo mismo y lo atribuyeron a una lenta acumulación de los lípidos en los enterocitos, Loewe y Eckmann (1988) atribuyeron el crecimiento de las vacuolas a una deficiencia en la tasa de transferencia de los triglicéridos almacenados por parte de los enterocitos, sin embargo, Rösch y Segner (1990) mencionan que no existe evidencia para considerar la lenta acumulación de lípidos como una situación patológica.

En el presente trabajo, las vacuolas aumentan de tamaño y número con el desarrollo, lo cual se sabe que es debido a la acumulación de lípidos por parte de los enterocitos (Tanaka, 1973; Stroband y Dabrowski, 1979; Kjørsvik *et al.*, 1991; Verreth *et al.*, 1992). Dabrowski *et al.* (1989), Rösch y Segner (1990) y Segner y Rösch (1998) encontraron que la evidencia histológica inicial de la absorción de lípidos varía de acuerdo a la composición de la dieta. Al alimentar las larvas con zooplancton, inicialmente se distinguieron pequeñas inclusiones de lipoproteínas en el retículo endoplásmico y posteriormente se distinguieron grandes gotas de lípidos, mientras que cuando las larvas se alimentaron con una dieta artificial, no se observan las inclusiones de lipoproteínas.

Al mismo tiempo que en el intestino anterior se hacían presentes las vacuolas digestivas, en el intestino posterior de la cabrilla arenera se presentan

pequeñas vesículas positivas a la reacción de Nihidrina-Schiff. Estas vesículas se han reportado en muchas especies y en todas han sido asociadas con la absorción de proteínas (Iwai y Tanaka, 1968; Tanaka, 1972b; Stroband *et al.*, 1979; Stroband y Kroon, 1981; Stroband y van Der Veen, 1981; Kjørsvik *et al.*, 1991; Calzada *et al.*, 1998; Watanabe, 1982a, 1982b, 1984b; Porter y Theilacker, 1999).

Se sabe que el tubo digestivo de las larvas está menos desarrollado que el de los adultos, por lo que su capacidad digestiva está limitada (Govoni *et al.*, 1986). Esto implica que los mecanismos de absorción de proteínas son diferentes entre ambos periodos del ciclo de vida. Se ha registrado que las larvas de peces, al igual que los mamíferos recién nacidos, utilizan el mismo mecanismo de absorción de proteínas conocido como pinocitosis, en donde las proteínas son absorbidas sin una degradación previa debido a un sistema enzimático gástrico pobremente desarrollado (Tanaka, 1973; Stroband *et al.*, 1979; Watanabe, 1981, 1982b, 1984a, 1984b; Ash, 1985; Govoni *et al.*, 1986; Kjørsvik *et al.*, 1991; Sarasquete *et al.*, 1995; Segner, 1996; Calzada *et al.*, 1998), aunque Tanaka *et al.* (1972), Stroband y Dabrowski (1979), Sarasquete *et al.* (1993b) registraron la presencia de pepsina en las larvas de algunas especies de peces. Por microscopía electrónica se describió el proceso de pinocitosis en diferentes especies (Iwai y Tanaka, 1968; Stroband *et al.*, 1979; Stroband y van Der Veen, 1981; Watanabe, 1981, 1984a, 1984b).

Watanabe (1982b, 1984a) caracterizó el proceso de pinocitosis en cinco etapas: ingestión, transporte, acumulación, digestión y extinción. Observó también que el tiempo en que se completa cada una de estas etapas varía para cada especie.

Algunos autores, no están totalmente de acuerdo con que la pinocitosis sea un mecanismo de nutrición, la consideran más bien como un mecanismo inmunológico ya que argumentan que no existe una selectividad por parte de los

enterocitos del intestino posterior para distinguir a las proteínas (Dabrowski, 1986; Rombout y Berg, 1989), y otros consideran que el tiempo en que se logra la digestión intracelular es muy lento, ya que puede variar de horas a días, sobretodo cuando se considera la alta tasa de crecimiento de las larvas (Dabrowski, 1984).

Sin embargo, Mendoza-Alfaro (1994) realizó una revisión sobre el uso de métodos inmunológicos en la comprobación de pinocitosis como mecanismo de nutrición en peces. Por otro lado, observando la curva de crecimiento de *P. maculatofasciatus* demuestra dos etapas generales: a) una inicial en la que durante los primeros 16 días, la tasa de crecimiento es relativamente baja y b) una segunda etapa a partir del día 16 dde en que la tasa de crecimiento aumenta. Es muy probable, que el crecimiento de las larvas esté en función de la velocidad de digestión intracelular de proteínas. Para corroborar el tiempo de digestión intracelular, es necesario utilizar marcadores y técnicas de microscopía electrónica, que permitan seguir el desarrollo de las vesículas dentro de los enterocitos. Debe considerarse también, que las proteínas no son la única fuente de energía con la que cuentan las larvas para su crecimiento, sino que los carbohidratos son la fuente energética primaria, y como se ha demostrado en este trabajo, son los primeros que se absorben.

Recientemente, se ha demostrado que la principal fuente energética durante el desarrollo embrionario y larvario son los aminoácidos libres presentes en el alimento vivo (Rønnestad *et al.*, 1999), los cuales son absorbidos por transporte activo mediante gradientes de concentración (Ash, 1985; García-Gallego y Sanz-Rus, 1987).

A los 16 días después de la eclosión, en las larvas de *P. maculatofasciatus* ocurre la aparición de las glándulas gástricas, en otras especies, se ha encontrado que el tiempo de aparición de las glándulas gástricas es muy variado (Tanaka, 1973; Grizzle y Curd, 1978; Ferraris *et al.*, 1987; Segner y Rösch, 1998; Stroband y Kroon, 1981). De acuerdo a Govoni *et al.* (1986), la aparición de las glándulas

gástricas y de los ciegos pilóricos, representa el último gran evento en el desarrollo del tubo digestivo de las larvas de peces. Estas estructuras se consideran tan importantes, que para algunos autores no sólo son la única diferencia estructural entre larvas y juveniles, sino que son las que definen el final del periodo larval y el inicio del periodo juvenil, en términos del desarrollo del tubo digestivo (Tanaka, 1973; Stroband y Dabrowski, 1979; Watanabe, 1984b; Boulhic y Gabaudan, 1992; Bisbal y Bengtson, 1995; Sarasquete *et al.*, 1995).

En las especies que presentan un estómago, incluyendo lo observado en este trabajo, se observa que las glándulas gástricas siempre se desarrollan primero en la región anterior del estómago. Reifel y Travill (1978) y Stroband y Kroon (1981) definen a esta región como el cuerpo. En la región posterior del estómago o píloro (Reifel y Travill, 1978) de otras especies, incluyendo lo observado en este trabajo, no se observan glándulas gástricas (Stroband y Kroon, 1981; Tanaka, 1973; Grizzle y Curd, 1978). No obstante, las tunicas muscular y submucosa se han desarrollado de una manera significativamente mayor en el píloro que en otras regiones. Esto sugiere que el píloro no interviene en el proceso de secreción de enzimas ni de ácido clorhídrico (Tanaka, 1973) sino que participa en la digestión mecánica (Ferraris *et al.*, 1987) y en el transporte del alimento hacia el intestino anterior por medio de contracciones musculares del esfínter pilórico (Reifell y Travil, 1978).

En el presente trabajo, se observa que el primer ciego pilórico aparece casi al mismo tiempo que las glándulas gástricas en las larvas de *P. maculatofasciatus*. Esto significa que su función está más encaminada al proceso de absorción del alimento (Tanaka, 1973; García-Gallego y Sanz-Rus, 1987), lo cual se refuerza cuando se comprueba que tienen la misma estructura histológica que el intestino anterior (Hidalgo y Alliot, 1987).

La aparición de las glándulas gástricas, coincide con el hecho de que las vacuolas digestivas y las vesículas pinocitóticas presentes en el tubo digestivo de

las larvas de *P. maculatofasciatus* alcanzan su tamaño máximo. Posteriormente, ambas comienzan a disminuir en tamaño y número hasta desaparecer. Esta sincronía entre vacuolas-vesículas-glándulas gástricas fue descrita por Tanaka (1973) en cerca de 15 especies. Lo atribuyó a que la presencia de glándulas gástricas trae como consecuencia un cambio radical en los mecanismos de digestión del alimento.

Sin embargo, esto es cierto en parte, sobretudo en el caso de la digestión de proteínas, no así en el mecanismo de digestión de lípidos. Una vez que aparecen las glándulas gástricas y eventualmente desaparecen las vesículas pinocitóticas, es posible que la pinocitosis ha disminuido o ha cesado durante el periodo juvenil ya que en los juveniles y adultos de peces que presentan estómago, la digestión proteica inicia en el estómago por las proteasas que empiezan a ser secretadas. De igual modo, la mucosa intestinal, el páncreas y los ciegos pilóricos son las fuentes de las enzimas digestivas (Phillips, 1969; Kapoor *et al.*, 1975).

En el intestino, la tripsina y la quimotripsina pancreáticas son más importantes, los polipéptidos formados son separados después por la carboxipeptidasa pancreática y las peptidasas intestinales (Ash; 1985; Fänge y Grove, 1979) en aminoácidos libres que posteriormente son absorbidos mediante un gradiente de concentraciones ligado al transporte de iones (Ash, 1985; García-Gallego y Sanz-Rus, 1987). Sin embargo, en los peces que no tienen un estómago verdadero, la pinocitosis continúa en el segundo segmento del intestino de juveniles y adultos (Stroband *et al.*, 1979; Stroband y van Der Veen, 1981; Dabrowski *et al.*, 1986), aunque en mucho menor cantidad (Watanabe, 1982b; Ash, 1985; Dabrowski, 1986) y velocidad (Watanabe, 1982b).

En el caso de la digestión de lípidos, una vez dentro de los enterocitos, los ácidos grasos y los monoglicéridos absorbidos, son transformados nuevamente en triglicéridos en el retículo endoplásmico. Posteriormente, son almacenados y

eventualmente abandonan la célula mediante exocitosis hacia la membrana basal (Segner, 1996), en forma de quilomicrones (Stroband y Dabrowski, 1979, Stroband y Kroon, 1981; Loewe y Eckmann, 1988), vía el torrente sanguíneo hacia el hígado, donde son almacenados (Cowey y Sargent, 1979; Lehninger, 1990; Leger, 1985; Sargent *et al.*, 1989; Kjørsvik *et al.*, 1991). Loewe y Eckmann (1988) atribuyeron el crecimiento de las vacuolas a una deficiencia en la tasa de transferencia de los triglicéridos almacenados por parte de los enterocitos. Para el momento en que se desarrollan las glándulas gástricas, los lípidos siguen siendo digeridos de igual manera que cuando no se presentaban las glándulas gástricas. Así, que el hecho de que las vacuolas digestivas disminuyan de tamaño posterior a la aparición de las glándulas gástricas, significa que los enterocitos del intestino anterior han alcanzado su estado de desarrollo máximo, el cual les permite llevar a cabo el transporte de los triglicéridos a una tasa mucho mayor, evitando la acumulación de los mismos y por consiguiente la formación de vacuolas digestivas.

Sarasquete *et al.* (1995), observaron una disminución en el número y tamaño de las vacuolas digestivas, al mismo tiempo que observaban un aumento de partículas lipídicas (presumiblemente quilomicrones) en los espacios intracelulares de los enterocitos del intestino anterior en larvas de *Sparus aurata*. En el caso de las larvas de *P. Maculatofasciatus*, los enterocitos del intestino anterior requieren de algunos días para poder alcanzar su estado de desarrollo máximo, como sea, es necesario realizar estudios encaminados a describir a fondo el proceso de la digestión de lípidos.

Se ha explicado, que no es posible el destete temprano desde el momento de la primera alimentación, ya que el tubo digestivo no presenta la capacidad fisiológica que le permita procesar con éxito una dieta artificial. Actualmente, durante el cultivo de las larvas de *P. maculatofasciatus* el destete se lleva a cabo alrededor de los 20 días dde, y se realiza alimentando a las larvas con una mezcla de alimento vivo y dieta artificial, del mismo modo que se realiza con otras

especies (Holt, 1993; Person-Le Ruyet *et al.*, 1993; Sorgeloos, 1994; Rosenlund *et al.*, 1997; Cañavate y Fernández-Díaz, 1999). Sin embargo, con base en el marco anteriormente descrito, es muy posible adelantar el momento del destete. Se propone modificar el calendario de alimentación que se realiza con las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*, empezando a partir de los 15 días dde, ya que las larvas de mayor talla han desarrollado glándulas gástricas.



CONCLUSIONES

El desarrollo ontogenético del tubo digestivo de las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*, sigue el patrón básico de las especies que presentan un tubo digestivo indiferenciado al momento de la eclosión (Tanaka, 1973). Dicho patrón, se caracteriza por un desarrollo gradual de las estructuras morfológicas de los componentes del tubo digestivo.

Al momento de la primera alimentación, el tubo digestivo cuenta con los elementos morfológicos y la capacidad digestiva mínimos necesarios para realizar con éxito la ingestión, digestión y absorción del alimento vivo suministrado.

La completa diferenciación inicial del tubo digestivo de las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*, ocurre a los 5 días dde, cuando es posible observar bucofaringe, esófago, estómago, intestino anterior, intestino posterior y recto.

La absorción de carbohidratos, ocurre poco después de iniciada la alimentación exógena en el borde plumoso de ambos intestinos. La acumulación de glucógeno en el hígado inicia al mismo tiempo y se mantiene durante todo el desarrollo.

Los lípidos son absorbidos por los enterocitos de la región media del intestino anterior, las vacuolas digestivas aparecen a partir de los 4 días de

iniciada la alimentación exógena, aumentan en número y tamaño y eventualmente desaparecen con la aparición de las glándulas gástricas.

Las proteínas se absorben en el intestino posterior mediante pinocitosis. Las vesículas pinocitóticas aparecen al día 4 después de iniciada la alimentación exógena y desaparecen gradualmente después de la aparición de las glándulas gástricas.

A partir del día 16 después de la eclosión a una temperatura de 25 °C, cuando las larvas presentan una longitud total de 9.3 mm, el tubo digestivo de *Paralabrax maculatofasciatus* cuenta con todos los elementos digestivos estructurales bien desarrollados.

VI

RECOMENDACIONES

- Con base al presente trabajo, se recomienda cambiar el calendario de alimentación que se emplea actualmente durante el cultivo de las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*. Se recomienda iniciar el destete a partir del día 16, cuando las larvas alcanzan una longitud total de 9.3 mm, mediante una alimentación de alimento vivo y dieta artificial (Fig, 52).

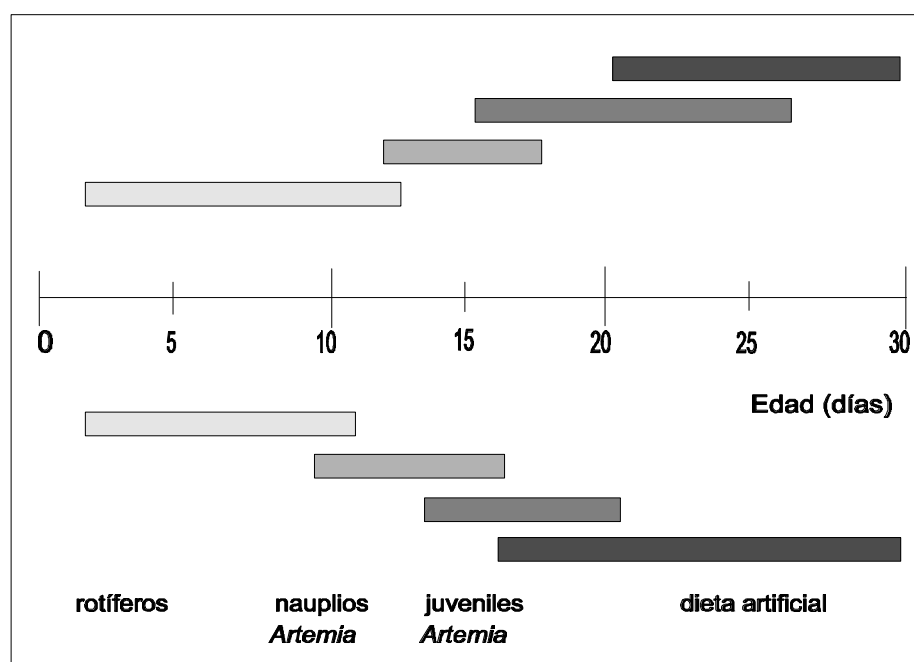


Figura 52. - Calendario de alimentación actual (arriba) y calendario de alimentación propuesto (abajo), para el cultivo larval de *Paralabrax maculatofasciatus*.

-
- Con el objetivo de esclarecer y abordar de manera específica el proceso digestivo de las larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*, se recomienda realizar estudios enzimohistoquímicos, que permitan describir el proceso digestivo desde un punto de vista fisiológico, al conocer el desarrollo de la actividad enzimática presente en el tubo digestivo.



REFERENCIAS

- Aguilera-González, C.J. 1999. **Bases fisiológicas del desarrollo de larvas del catán (*Atractosteus spatula*) y perspectivas para su cultivo.** Tesis de Doctorado. U.A.N.L. México. 186 pp.
- Alarcón-López, F.J. y M.I. Martínez-Díaz. 1998. Fisiología de la digestión en larvas de peces marinos y sus aplicaciones al cultivo larvario en masa. **Aquatic**, Nov. 5 : 1-7.
- Alvarez-González, C.A. 1999. **Optimización del proceso de producción de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae) en sistemas de circulación cerrada.** Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN. 108 pp.
- Ash, R. 1985. **Protein digestion and absorption.** 69-93 pp. En: C.B. Cowey, A.M. Mackie y J.G. Bell (eds.). Nutrition and feeding in fish. Academic Press. Great Britain.
- Avilés-Quevedo, A., U. McGregor-Pardo, R. Rodríguez-Ramos, O. Morales-Castro, M. A. Huerta-Bello y M. Iizawa. 1995. **Biología y cultivo de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner,1868).** Centro Regional de Investigaciones Pesqueras-La Paz. México. 35 pp.

- Balon, E.K. 1975. Terminology of intervals in fish development. **J. Fish. Res. Board Can.** 32 : 1663-1670.
- Balon, E.K. 1984. Reflections on some decisive events in the early life of fishes. **Trans. Am. Fish. Soc.** 113 : 178-185.
- Balon, E.K. 1986. **Types of feeding in the ontogeny of fishes and the life-history model.** 11-24 pp. En: A.C. Simestad y G.M. Cailliet (eds.) Contemporary studies of fish feeding: the proceedings of GUTSHOP '84. California, U.S.A.
- Bardach, J. E., J. H. Ryther y W. O. Mclarney. 1986. **Acuacultura, crianza y cultivo de organismos marinos y de agua dulce.** AGT Editor. México. 741 pp.
- Basch, P.F. 1986. An alginate matrix double-embedding method for paraffin sectioning of minute specimens. **Stain Technol.** 61 : 235-238.
- Beccaria, C., J.P. Díaz, R. Cones y B. Chatain. 1991. Organogenesis of the exocrine pancreas in the sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., reared extensively and intensively. **Aquaculture** 99 : 339-354.
- Bengtson, D.A. 1993. A comprehensive program for the evaluation of artificial diets. **J. World Aquacult. Soc.** 24 : 199-210.
- Bisbal, G.A. y D.A. Bengtson. 1995. Development of the digestive tract in larval summer flounder. **J. Fish Biol.** 47 : 277-291.
- Blaxter, J.H.S. 1969. **Development: eggs and larvae.** 177-252 pp. En: W.S. Hoar, D.J. Randall y J.R. Brett (eds.) Fish Physiology. Vol. III. Academic Press. U.S.A.

- Blaxter, J.H.S. 1988. **Pattern and variety in development**. 1-58 pp. En: W.S. Hoar y D.J. Randall (eds.). Fish Physiology. Vol IX A. Academic Press. U.S.A.
- Boulhic, M. y J. Gabaudan. 1992. Histological study of the organogenesis of the digestive system and swim bladder of the Dover sole, *Solea solea* (Linnaeus, 1758). **Aquaculture** 102 : 373-396.
- Buddington, R.K. y S.I. Doroshov. 1986. Structural and functional relations of the white sturgeon alimentary canal (*Acipenser transmontanus*). **J. Morphol.** 190 : 201-213.
- Butler, J.L., H.G. Moser, G.S. Hageman y L.E. Nordgren. 1982. Developmental stages of three California sea basses (*Paralabrax*, Pisces: Serranidae). **Cal. Coop. Ocean Fish. Invest. Rep.** 23 : 252-268.
- Cahu, C.L. y J.L. Zambonino-Infante. 1997. Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for compound diet feeding?. **Aquacult. Int.** 5 : 151-160.
- Cahu, C.L., J.L. Zambonino-Infante, A.M. Escaffre, P. Bergot y S. Kaushik. 1998. Preliminary results on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae rearing with compound diet from first feeding. Comparison with carp (*Cyprinus carpio*) larvae. **Aquaculture** 196 : 1-7.
- Calzada, B.A. 1996. **Desarrollo postembrionario del intestino y órganos asociados de la dorada, *Sparus aurata* L., en cultivo. Estudio histológico y ultraestructural**. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz. España. 258 pp.

- Calzada, B.A., A. Medina y M.L. González de Canales. 1998. Fine structure of the intestine development in cultured sea bream larvae. **J. Fish Biol.** 53 : 340-365.
- Cañavate, P.J. y C. Fernández-Díaz. 1999. Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. **Aquaculture** 174 : 255-263.
- Clements, D. K. y J. H. Choat. 1993. Influence of season, ontogeny and tide on the diet of the temperate marine herbivorous fish *Odax pullus* (Odacidae). **Mar. Biol.** 117 : 213-220.
- Cousin, J.C.B., F. Baudin-Laurencin y J. Gabaudan. 1987. Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting turbot, *Scophthalmus maximus*. **J. Fish Biol.** 30 : 15-33.
- Cowey, C.B. y J.R. Sargent. 1979. **Nutrition.** 1-69 pp. En: W.S. Hoar, D.J. Randall y J.R. Brett (eds.). Fish Physiology. Vol. VIII. Academic Press.
- Dabrowski, K. 1984. The feeding of fish larvae: present "state of the art" and perspectives. **Reprod. Nutr. Dévelop.** 24 : 807-833.
- Dabrowski, K. 1986. Ontogenetical aspects of nutritional requirements in fish. **Comp. Biochem. Physiol.** 85 A : 639-655.
- Dabrowski, K. 1991. **Dietary requirements for freshwater fish larvae in search of a common thread.** 9-10 pp. En: P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers y F. Ollevier (eds.) Larvi'91- Fish & crustacean larviculture symposium. European aquaculture Society, Special Publication No. 15, Gent, Belgium.

- Dabrowski, K., T. Murai y K. Becker. 1986. Physiological and nutritional aspects of intensive feeding of carp. 55-70. En: R. Billard y J. Marcel (eds.). **Aquaculture of Cyprinids**. U.S.A.
- Dabrowski, K., H. Segner, R. Dallinger, S. Hinterleitner, C. Sturmbauer y W. Wieser. 1989. Rearing of cyprinid fish larvae: the vitamin C-minerals interrelationship and nutrition-related histology of the liver and intestine of roach (*Rutilus rutilus* L.). **J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.** 62 : 188-202.
- Davenport, H.A. 1960. **Histological and histochemical techniques**. W. B. Saunders Company. U.S.A. 401pp.
- de Robertis, E.D.P., F.A. Saez y E.M.F. de Robertis. 1977. **Biología Celular**. El Ateneo Editorial. Argentina. 528 pp.
- Eliséiev, V.G., Y.I. Afanasiev y N.A. Yurina. 1983. **Histología**. Ed. Mir. Rusia. 584pp.
- Fänge, R. y D. Grove. 1979. **Digestion**. 161-260 pp. En: W.S. Hoar, y D.J. Randall (eds.) Fish Physiology. Vol. VIII. Academic Press. U.S.A.
- Ferraris, R.P., J.D. Tan y M.C. de la Cruz. 1987. Development of the digestive tract of the milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal): histology and histochemistry. **Aquaculture** 61 : 241-257.
- Fyhn, H.J. 1989. First feeding of marine fish larvae: are free amino acids the source of energy? **Aquaculture** 80 : 111-120.
- García-Gallego, M. y A. Sanz-Rus. 1987. **Absorción intestinal en peces**. 123-198 pp. En: J. Espinosa de los Monteros, y U. Labarta (eds.) Nutrición en acuicultura. Vol. 2. FEUGA. España.

- Gawlicka, A., S.J. Teh, S.S.O. Hung, D.E. Hinton y J. de la Noüe. 1995. Histological and histochemical changes in the digestive tract of the white sturgeon larvae during ontogeny. **Fish Physiol. Biochem.** 14 : 357-371.
- Gisbert, E., M.C. Sarasquete, P. Williot y F. Castelló-Orvay. 1999. Histochemistry of the development of the digestive system of Siberian sturgeon during early ontogeny. **J. Fish Biol.** 55 : 596-616.
- Govoni, J.J., G.W. Boehlert y Y. Watanabe. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. **Environ. Biol. Fish.** 16 : 59-77.
- Grizzle, J.M. y M.R. Curd. 1978. Posthatching histological development of the digestive system and swim bladder of logperch, *Percina caprodes*. **Copeia** 31 : 448-455.
- Guyot, E., J.P. Díaz y R. Connes. 1995. Organogenesis of the liver in sea bream. **J. Fish Biol.** 47 : 427-437.
- Hastings, A.P. 1989. Protogynous hermafroditism in *Paralabrax maculatofasciatus* (Pisces: Serranidae). **Copeia** 1: 184-188.
- Heemstra, P.C. 1995. **Serranidae**. 1565-1613 pp. En: W. Fisher, F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K.E. Carpenter y V. H. Niem (eds.). Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico Centro-Oriental. Vol III. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Roma.
- Heming, T.A. y R.K. Buddington. 1988. **Yolk absorption in embryonic and larval fishes**. 407-446 pp. En: W.S. Hoar y D.J. Randall (eds.) Fish Physiology. Vol. XI A. Academic Press. U.S.A.

- Hidalgo, F. y E. Alliot. 1987. **La digestión en los peces.** 85-122 pp. En: J. Espinosa de los Monteros, y U. Labarta (eds.) *Nutrición en acuicultura*. Vol. 1. FEUGA. España.
- Hofer, R. 1985. **Effects of artificial diets on the digestive processes of fish larvae.** 213-216 pp. En: C.B. Cowey, A.M. Mackie y J.G. Bell (eds.). *Nutrition and feeding in fish*. Academic Press. Great Britain.
- Holt, G.J. 1993. Feeding larval red drum on microparticulate diets in a closed recirculating water system. **J. World Aquacult. Soc.** 24 : 225-230.
- Horn, H. K. 1989. Biology of marine herbivorous fishes. **Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.** 27 : 167 – 272.
- Iwai, T. 1967. The comparative study of the digestive tracts of teleost larvae. I. Fine structure of the gut epithelium in larvae of ayu. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.** 33 : 489-496.
- Iwai, T. y M. Tanaka. 1968. The comparative study of the digestive tract of teleost larvae. III. Epithelial cells in the posterior gut of halfbeak larvae. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.** 34 : 44-48.
- Kanazawa, A. 1985. **Essential fatty acid and lipid requirement of fish.** 281-298 pp. En: C.B. Cowey, A.M. Mackie y J.G. Bell (eds.). *Nutrition and feeding in fish*. Academic Press. Great Britain.
- Kanazawa, A. 1998. **Nutrition of fish larvae.** IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Memorias. Vol. 2. 1998. La Paz, B.C.S. México.
- Kapoor, B.G., H. Smith y I.A. Verighina. 1975. The alimentary canal and digestion in teleosts. **Adv. Mar. Biol.** 13 : 109-239.

- Kissil, G.W. 1984. Overview: rearing larval stages of marine fish on artificial diets. **Isr. J. Zool.** 33 : 156-160.
- Kjørsvik, E., T. van der Meeren, H. Kryvi, J. Arnfinnson y P. G. Kvenseth. 1991. Early development of the digestive tract of cod larvae, *Gadus morhua* L., during start-feeding and starvation. **J. Fish Biol.** 38 : 1-15.
- Kjørsvik, E. y A.L. Reiersen. 1992. Histomorphology of the early yolk-sac larvae of the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) an indication of the timing of functionality. **J. Fish Biol.** 41 : 1-19.
- Kurokawa, T. y T. Suzuki. 1996. Formation of the diffuse pancreas and the development of digestive enzyme synthesis in the larvae of the japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture** 141 : 267-276.
- Lagler, K. F., J. E. Bardach, R. R. Miller y D. R. M. Passino. 1984. **Ictiología**. AGT. México. 489 pp.
- Lauff, M. y R. Hofer. 1984. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. **Aquaculture** 37 : 335-346.
- Lazo, J.P. 1999. **Development of the digestive system in red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae**. Tesis Doctoral. The University of Texas at Austin. U.S.A. 212 pp.
- Leeson, T.S., C.R. Leeson y A.A. Paparo. 1990. **Texo-Atlas de histología**. Interamericana-Mc Graw Hill. México. 741 pp.
- Leger, C. 1985. **Digestion, absorption and transport of lipids**. 299-331 pp. En: C.B. Cowey, A.M. Mackie y J.G. Bell (eds.). Nutrition and feeding in fish. Academic Press. Great Britain.

- Lehninger, A. L. 1990. **Bioquímica**. Omega. 2ª ed. Barcelona. España. 1117 pp.
- Loewe, H. y R. Eckmann. 1988. The ontogeny of the alimentary tract of coregonid larvae: normal development. **J. Fish Biol.** 33 : 841-850.
- Matus-Nivón, E., R. Ramírez-Sevilla, R. Martínez- Pecero y J.L. Ortiz-Galindo. 1990. **Potencial acuacultural de ocho especies de peces marinos del Pacífico mexicano, con base en su biología temprana**. 68-74 pp. En: G. de la Lanza-Espino y J.L. Arredondo-Figueroa (eds.) La Acuicultura en México: de los conceptos a la producción. UNAM. México.
- Maximow, A. A. y W. Bloom. 1957. **A textbook of histology**. W.B. Saunders Company. U.S.A. 628 pp.
- Mendoza-Alfaro, R. 1994. **Utilización de métodos inmunológicos en el estudio de la nutrición de organismos marinos**. 129-155 pp. En: Mendoza-Alfaro, R.E., L.E. Cruz-Suárez y R.M. Denis (eds.). Segundo Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Memorias. Monterrey, Nuevo León, México.
- Miller, D.J. y R.N. Lea. 1972. Guide to the coastal marine fishes of California. **Calif. Fish Bull.** 157 : 249 pp.
- Morrison, C.M., D.J. Martell y C. Leggidario. 1997. Ciliated epithelium in the developing digestive tract of the larva of the Atlantic halibut, and comparison with that of the cod. **J. Fish Biol.** 50 : 120-126.
- Munilla-Morán, R., J.R. Stark y A. Barbour. 1990. The role of exogenous enzymes in digestion in cultured turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). **Aquaculture** 88 : 337-350.

- Muñetón-Gómez, M.S., R.I. Ochoa-Báez y J.R. Torres-Villegas. 1989. Valoración de la inclusión doble alginato-parafina aplicada para estudios histológicos en larvas de peces. **Inv. Mar. CICIMAR** 4 : 281-284.
- Nelson, J.S. 1994. **Fishes of the world**. John Wiley & Sons, Inc. 3ª ed. U. S. A. 600 pp.
- Pandian, T.J. y E. Vivekanandan. 1985. **Energetics of feeding and digestion**. 99-125 pp. En: P. Tytler y W. Calow. (eds.). Fish energetics: new perspectives. The Johns Hopkins University Press. U. S. A.
- Pedersen, T. y I. B. Falk-Petersen. 1992. Morphological changes during metamorphosis in cod (*Gadus morhua* L.), with particular reference to the development of the stomach and pyloric caeca. **J. Fish Biol.** 41 : 449-461.
- Person Le Ruyet, J.P., J.C. Alexandre, L. Thebaud y C. Mugnier. 1993. Marine fish larvae feeding: formulated diets or live prey?. **J. World Aquacult. Soc.** 24 : 211-224.
- Phillips, Jr. M.A. 1969. **Nutrition, and energy utilization**. 391-432 pp. En: W.S. Hoar, D.J. Randall y J.R. Brett (eds.) Fish Physiology. Vol. I. Academic Press. U.S.A.
- Pirlot, P. 1976. **Morfología evolutiva de los cordados**. Omega. España. 966 pp.
- Porter, S.M. y G.H. Theilacker. 1999. The development of the digestive tract and eye in larval walleye pollock, *Theragra chalcogramma*. **Fish. Bull.** 97: 722-729.
- Rana, K.J., 1997. **Trends in global production, 1984-1995**. En: FAO inland water resources and aquaculture service, fishery resources division (ed.) Review

- of the state of world aquaculture. FAO Fisheries Circular. NO. 886, Rev.1. Rome, FAO. 163 pp.
- Reifel, C.W. y A.A. Travill. 1978. Structure and carbohydrate histochemistry of the stomach in eight species of teleosts. **J. Morphol.** 158 : 155-168.
- Reinecke, M., C. Müller y H. Segner. 1997. An immunohistochemical analysis of the ontogeny, distribution and coexistence of 12 regulatory peptides and serotonin in endocrine cells and nerve fibres of the digestive tract of the turbot, *Scophthalmus maximus* (Teleostei). **Anat. Embryol.** 195 : 87-102.
- Ribeiro, L., J.L. Zambonino-Infante, C. Cahu y M.T. Dinis. 1999. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup, 1858. **Aquaculture** 179 : 465-473.
- Rombout, J.W.H.M. y A.A. Berg. 1989. Immunological importance of the second gut segment of carp. I. Uptake and processing of antigens by epithelial cells and macrophages. **J. Fish Biol.** 35 : 13-22.
- Romer, A.S. y T.S. Parsons. 1981. **Anatomía comparada**. 5ª ed. Nueva editorial Interamericana. México. 428 pp.
- Rønnestad, I., A. Thørsen y R.N. Finn. 1999. Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acids. **Aquaculture** 177 : 201-216.
- Roo, F.J., J. Socorro, M.S. Izquierdo, M.J. Caballero, C.M. Hernández-Cruz, A. Fernández y 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.

- Rosales – Velázquez, M.O. 1997. **Efecto de la alimentación sobre los desoves de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Teleostei: Serranidae) mantenida en cautiverio.** Tesis de Maestría. CICIMAR – IPN. México. 62 pp.
- Rösch, R., y H. Segner. 1990. Development of dry food for larvae of *Coregonus lavaretus* L. I. Growth, food digestion and fat absorption. **Aquaculture** 91: 101-115.
- Rosenlund, G., J. Stoss y C. Talbot. 1997. Co-feeding marine fish larvae with inert and live diets. **Aquaculture** 155 : 183-191.
- Ruiz-Treviño, J.V. 2000. **Caracterización bioquímica de las principales enzimas digestivas del catán (*Atractosteus spatula*).** Tesis de Licenciatura. U.A.N.L. México. 76pp.
- Sale, F. P. 1991. **The ecology of fishes on coral reefs.** Academic Press, Inc. U.S.A. 754 pp.
- Sarasquete, M.C., A. Polo y M.L. González de Canales. 1993a. A histochemical and immunohistochemical study of digestive enzymes and hormones during the larval development of the sea bream, *Sparus aurata* L. **Histochem. J.** 25 : 430-437.
- Sarasquete, M.C., A. Polo y M. Yúfera. 1995. Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead seabream, *Sparus aurata* L. **Aquaculture** 130 : 79-92.
- Sarasquete, M.C., A Polo, E. Pascual y M. Yúfera. 1993b. **Histochemistry of proteins, lipids and carbohydrates in the yolk of oocytes, eggs and**

- larvae of seabream (*Sparus aurata*).** 309-314 pp. En: B.T. Walther, y H.J. Fyhn (eds.). Physiological and biochemical aspects of fish development. Univ. of Bergen, Norway.
- Sarasquete, M.C., M.L. González de Canales, J.M. Arellano, J.A. Muñoz-Cueto, L. Ribeiro y M.T. Dinis. 1996. Histochemical aspects of the yolk-sac and digestive tract of the larvae of the Senegal sole, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). **Histol. Histopathol.** 11 : 881-888.
- Sargent, J.R., R.J. Henderson y D.R. Tocher. 1989. **The lipids.** 153-218 pp. En: J.E. Halver (ed.) Fish nutrition. Academic Press. U.S.A.
- Segner, H. 1996. **Nutritional physiology in fish larvae.** 1-24 pp. En: J. Verreth (ed.). 6th. Int. Course of fish larvae nutrition (ERASMUS). May 6-14 1996.
- Segner, H., R. Rösch, H. Schmidt y K. J. Von Poeppinghausen. 1988. Studies on the suitability of commercial dry diets for rearing of larval *Coregonus lavaretus* from Lake Constance. **Aquat. Living Resour.** 1 : 231-238.
- Segner, H., R. Rösch, H. Schmidt y K.J. von Poeppinghausen. 1989. Digestive enzymes in larval *Coregonus lavaretus* L. **J. Fish Biol.** 35 : 249-263.
- Segner, H., R. Rösh, J. Verreth y U. Witt. 1993. Larval nutritional physiology: studies with *Clarias gariepinus*, *Coregonus lavaretus* and *Scophthalmus maximus*. **J. World Aquacult. Soc.** 24 : 121-134.
- Segner, H. y R. Rösch. 1998. Ontogeny of digestive and metabolic functions in *Coregonus lavaretus*. **Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.** 50 : 1-14.

- Sepesca. 1994. **Desarrollo científico y tecnológico del cultivo de la cabrilla.** Sepesca/UABCS. México. 93 pp.
- Smith, L.S. 1989. **Digestive functions in teleost fishes.** 331-422 pp. En: J.E. Halver (ed.) Fish Nutrition. Academic Press. U. S. A.
- Sorgeloos, P. 1994. State of the art in marine fish larviculture. **World Aquacult.** 25 : 34-37.
- Sorgeloos, P., P. Lavens, Ph. Léger y W. Tackaert. 1991. **State of the art in larviculture of fish and shellfish.** 3-5 pp. En: P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers y F. Ollevier (eds.). Larví'91- Fish & crustacean larviculture symposium. European aquaculture Society, Special Publication No. 15, Gent, Belgium.
- Spannhof, L. 1966. **Histoquímica práctica.** Ed. Acribia. Zaragoza, España. 195 pp.
- Steffens, W. 1989. **Principles of fish nutrition.** Ellis Horwood Limited. England. 358 pp.
- Strickland, J.D.H. y T.R. Parsons. 1972. **A practical handbook of seawater analysis.** The Alger Press. U. S. A. 310 pp.
- Stroband, H.W.J. 1977. Growth and diet dependent structural adaptations of the digestive tract in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*, Val.). **J. Fish Biol.** 11 : 167-174.
- Stroband, H.W.J. y K.R. Dabrowski. 1979. **Morphological and physiological aspects of the digestive system and feeding in fresh-water fish larvae.**

- 355-376 pp. En: M. Fontaine (ed.) La nutrition des poissons. CNERNA. París.
- Stroband, H.W.J., H. van der Meer y L.P. Timmermans. 1979. Regional functional differentiation in the gut of the grasscarp *Ctenopharyngodon idella* (Val.). **Histochemistry** 64 : 235-249.
- Stroband, H.W.J. y A.G. Kroon. 1981. The development of the stomach in *Clarias lazera* and the intestinal absorption of protein macromolecules. **Cell. Tiss. Res.** 215 : 397-415.
- Stroband, H.W.J. y F.H. van der Veen. 1981. Localization of protein absorption during transport of food in the intestine of grasscarp, *Ctenopharyngodon idella*. **J. Exp. Zool.** 218 : 149-156.
- Tanaka, M. 1969. Studies on the structure and function of the digestive system in teleost larvae. I. Development of the digestive system during prelarval stage. **Jap. J. Ichthyol.** 16 : 1-9.
- Tanaka, M. 1971. Studies on the structure and function of the digestive system in teleost larvae. III. Development of the digestive system during postlarval stage. **Jap. J. Ichthyol.** 18 : 164-174.
- Tanaka, M. 1972a. Studies on the structure and function of the digestive system in teleost larvae. IV. Changes in the epithelium related to fat absorption in the anteromedian part of the intestine after feeding. **Jap. J. Ichthyol.** 19 : 15-25.
- Tanaka, M. 1972b. Studies on the structure and function of the digestive system in teleost larvae. V. Epithelial changes in the posterior-gut and protein ingestion. **Jap. J. Ichthyol.** 19 : 172-180.

- Tanaka, M. 1973. **Studies on the structure and function of the digestive system of teleost larvae.** Ph. D. Thesis. Kyoto University. Japan. 136 pp.
- Tanaka, M., S. Kawai y S. Yamamoto. 1972. On the development of the digestive system and changes in activities of digestive enzymes during larval and juveniles stage in ayu. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.** 38 : 1143-1152.
- Tucker, Jr., J.W. 1998. **Marine fish culture.** Kluwer Academic Publishers. Massachusetts. U.S.A. 750 pp.
- Verreth, J.A., E.H. Eding, G.R.M. Rao, F. Huskens y H. Segner. 1991. **Feeding strategies and nutritional physiology in early life of clariid catfishes.** 12-13 pp. En: P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers y F. Ollevier (eds.) Larví'91- Fish & crustacean larviculture symposium. European aquaculture Society, Special Publication No. 15, Gent. Belgium.
- Verreth, J. A., E. Torrele, E. Spazier, A. van der Sloiszen, J. H. W. M. Rombout, R. Booms y H. Segner. 1992. The development of a functional digestive system in the african catfish *Clarias gariepinus* (Burchell). **J. World Aquacult. Soc.** 23 : 286-298.
- Walford, J. y T.J. Lam. 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. **Aquaculture** 109 : 187-205.
- Watanabe, T. 1988. **Nutrition and growth.** 154-197 pp. En: J.C. Shepherd y R.N. Bromage (eds.) Intensive fish farming. BSP Professional Books. Gran Bretaña.
- Watanabe, T. y V. Kiron. 1994. Prospects in larval fish dietetics. **Aquaculture** 124: 223-251.

- Watanabe, Y. 1981. Ingestion of horseradish peroxidase by the intestinal cells in larvae or juveniles of some teleosts. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.** 47: 1299-1307.
- Watanabe, Y. 1982a. Ultrastructure of epithelial cells of the anteromedian intestine and the rectum in larval and juvenile teleosts. **Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.** 33: 217-228.
- Watanabe, Y. 1982b. Intracellular digestion of horseradish peroxidase by the intestinal cells of teleost larvae and juveniles. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.** 48: 37-42.
- Watanabe, Y. 1984a. An ultrastructural study of intracellular digestion of horseradish peroxidase by the rectal epithelium cells in larvae of a freshwater cottid fish *Cottus nozawae*. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.** 50 : 409-416.
- Watanabe, Y. 1984b. Morphological and functional changes in rectal epithelium cells of pond smelt during postembryonic development. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.** 50 : 805-814.
- Watanabe, Y. y N. Sawada. 1985. Larval development of digestive organs and intestinal absorptive functions in the freshwater goby *Chaenogobius annularis*. **Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab.** 47: 1-10.
- Wheater, P. R., H.G. Burkitt, P. Lancaster y P.J. Deakin. 1985. **Colour atlas of histology**. Longman Group UK Limited. Hong Kong. 159 pp.
- Yasutake, W.T. y J. H. Wales. 1983. **Microscopic anatomy of salmonids: an atlas**. Fish and Wild Life Service. U. S.A. 190 pp.

Zacarías-Soto, M. D. R. 1997. **Histología del estómago, corazón, hígado y riñón de *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1868), y sus modificaciones ante situaciones de estrés crónico.** Tesis de Maestría. U.A.B.C.S. México. 74pp.

ANEXO 1

Tabla 1.- Total de larvas recolectadas y distribución en las técnicas histológicas.

Edad (días)	Larvas recolectadas	Tipo de Tinción		
		H – E	PAS	N – S
0	150	25	25	25
1	55	11	10	12
2	67	12	13	11
3	58	10	9	10
4	60	8	11	11
5	47	7	7	8
6	44	10	8	10
7	48	10	10	10
8	55	12	12	11
9	49	10	10	10
10	52	10	10	10
11	51	10	10	10
12	50	10	10	10
13	60	12	13	11
14	50	10	11	9
15				
16	47	10	9	9
17				
18	46	9	8	10
19				
20	50	10	10	10
21				
22	50	10	10	10
23				
24	50	10	10	10
25				
26	51	11	10	10
27				
28	50	10	10	10
29				
30	14	2	3	3
Total		239	239	240
Gran Total	718			

Tabla 2.- Proceso de deshidratación e inclusión definitiva en parafina.

Inmersión	Tiempo (minutos)
Alcohol butílico 80°	30
Alcohol butílico 90° I	30
Alcohol butílico 90° II	30
Alcohol butílico 100°	30
Parafina I	15
Parafina II	15
Parafina III	Inclusión definitiva

ANEXO 2

Tabla 1.- Técnica general de Hematoxilina – Eosina.

Inmersión	Tiempo (minutos)
Americlear I	5
Americlear II	5
Americlear III	5
Alcohol etílico 96° I	5
Alcohol etílico 96° II	5
Alcohol etílico 70° I	5
Alcohol etílico 70° II	5
Agua común I	5
Agua común II	5
Hematoxilina de Harris	6
Agua común I	5
Agua común II	5
Agua amoniacal	5
Agua común I	5
Agua común II	5
Eosina	20 segundos
Alcohol etílico 96°	Remojar
Alcohol etílico absoluto I	Remojar
Alcohol etílico absoluto II	Remojar
Acetona	5
Acetona – Americlear	5
Americlear I	5
Americlear II	5
Americlear III	5

Tabla 2.- Técnica general de Acido Peryódico de Schiff.

Inmersión	Tiempo (minutos)
Americlear I	5
Americlear II	5
Alcohol etílico 96° I	5
Alcohol etílico 96° II	5
Alcohol etílico 70° I	5
Alcohol etílico 70° II	5
Agua destilada I	5
Agua destilada II	5
Acido peryódico al 0.5 %	10 a 15
Agua destilada I	Lavar
Agua destilada II	Lavar
Agua destilada III	Lavar
Solución de Schiff	15 a 45 a 4°C
Agua sulfurosa I	3
Agua sulfurosa II	3
Agua sulfurosa III	3
Agua común	10
Hematoxilina	3 a 6
Agua común	5
Agua amoniacal	Remojar
Agua corriente	Lavar
Alcohol etílico 70°	Remojar
Alcohol etílico 96°	Remojar
Alcohol etílico absoluto	Remojar
Acetona	5
Acetona – Americlear	5
Americlear I	5
Americlear II	5

Tabla 3.- Técnica general de Ninhidrina-Schiff.

Inmersión	Tiempo (minutos)
Americlear I	5
Americlear II	5
Americlear III	5
Alcohol etílico 96° I	5
Alcohol etílico 96° II	5
Alcohol etílico 70° I	5
Alcohol etílico 70° II	5
Ninhidrina a 37°	Toda la noche
Agua común	Lavar
Reactivo de Schiff	45
Agua común	Lavar
Hematoxilina	2
Agua común	Lavar
Alcohol etílico 96°	Remojar
Alcohol etílico absoluto I	Remojar
Alcohol etílico absoluto II	Remojar
Acetona	5
Acetona – Americlear	5
Americlear I	5
Americlear II	5
Americlear III	5