



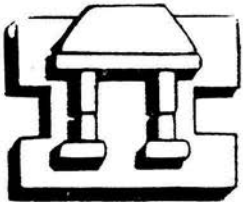
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

DESCRIPCION DE LA ESTRUCTURA Y LA
ULTRAESTRUCTURA DEL OVARIO DE *Chirostoma*
humboldtianum (VALENCIENNES 1835)

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
JOSE LUIS GONZALEZ BARAJAS

DIRECTOR: M. en C. RODOLFO CARDENAS REYGADAS



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEXICO

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Indice

Introducción	1
Objetivos	10
Metodología	11
Resultados	
Descripción histológica	13
Descripción ultraestructural	23
Análisis de resultados	25
Conclusiones	31
Bibliografía	36

Dedicatoria

A mis padres DON LUIS y DOÑA MARY, que me han dado todo y se que aun les falta mucho por darme.

A Paco y Ale, por tantas y tantas peleas, platicas y risas.

A pato.

Y a ti amigo o amiga, familiar o conocido si es que tienes en tu mano el punto final de mi formación profesional, es porque te quiero y de alguna forma me haz ayudado a llegar hasta aquí.

Agradecimientos

M. en C. Rodolfo Cárdenas Reygadas. De verdad mil gracias por todo prof.

Biol. Monica Chávez Maldonado. Gracias por todo el apoyo, tanto académico como moral.

Al laboratorio de neuromorfofisiología, a Patricia Aley Medina y Jesús Espinosa Villanueva.

Dr. en C. Luis Felipe Jiménez.

Introducción

En México se han registrado 375 especies de peces dulceacuícolas, la mayor parte de esta fauna (al menos el 60%) es exclusiva. Esta situación ubica a nuestro país como uno de los más importantes para la conservación de la biodiversidad ictiofaunística. (Méndez-Sánchez, et. al., 1996)

Chirostoma humboldtianum es un pez teleósteo, perteneciente a la familia Atherinidae, conocido comúnmente como charal (nombre derivado del tarasco *charae*), denominación que se aplica a varias especies, principalmente, a las formas dulceacuícolas de esta familia. Los Aterinidos son peces de cuerpo alargado y fusiforme, con la boca ligeramente puntiaguda. Los charales se pueden encontrar en los lagos y corrientes dulceacuícolas del altiplano, cuya distribución geográfica manifiesta un marcado endemismo (Torres, 1991). Este género es muy nutritivo y su consumo está arraigado en diversas comunidades, principalmente rurales. Durante la década de los ochentas la captura de charales fue de unas 7,500 toneladas por lo que se debe evaluar la posibilidad de su cultivo (*Op. cit.*).

Para lograr una producción adecuada se deben conocer todos los aspectos fisiológicos y morfológicos, para controlar los parámetros ambientales de manera que se logre una mayor productividad. En el caso de esta especie, poco se ha investigado acerca de las características

reproductivas de la misma. Se sabe que la reproducción de los teleósteos es muy diversa, que el grupo es predominantemente dioico, aunque en adultos y juveniles de algunas especies existe el hermafroditismo (Nagahama, 1983).

Esta complejidad reproductiva se ve reflejada en la amplia variedad de estructuras gonadales, aunque sus elementos sean similares en la morfología de las células germinales y varios tipos de células somáticas que constituyen el tejido gonadal (*Op. cit.*).

En muchos teleósteos, los ovarios son órganos huecos, pareados, y en ciertas especies se fusionan en la etapa juvenil para formar una sola estructura. El sistema reproductor de los peces, a diferencia de los mamíferos, es muy variable y refleja el amplio rango de modelos reproductivos, incluyendo la viviparidad. El ovario esta compuesto de ovogonias, ovocitos, células foliculares, tejido de sostén o estroma, frecuentemente musculatura, además de vasos sanguíneos, y terminaciones nerviosas (Harvey, 1979).

Wallace y Selman (1980), definieron siete etapas por las que pasa el ovocito antes de estar completamente maduro y listo para fecundado: El estadio I, también conocido como cromatina nucleolar (CN), consiste en ovocitos pequeños, embebidos en lamelas ovígeras, con un núcleo esférico comparativamente grande en relación con el tamaño de la célula. En el estadio II, el perinucleolar (PN), se observa un núcleo relativamente grande y dentro de él, varios hilos de cromatina, se aprecian además, numerosos

nucleólos que se distribuyen en la periferia. Durante el estadio III, las vesículas vitelinas (VV) se acumulan centripetamente y crecen hasta dar al citoplasma un aspecto totalmente vacuolado. Para el estadio IV que es la vitelogénesis primaria (VP), el contorno del núcleo pierde claridad y se observan proyecciones hacia el citoplasma. En esta fase se forman las plaquetas de vitelo. El estadio V o vitelogénesis secundaria (VS), es el momento donde se acumulan rápidamente plaquetas de vitelo en el citoplasma, paralelo a un acelerado crecimiento del ovocito. En la vitelogénesis terciaria (VT) o estadio VI, el núcleo empieza su migración hacia el polo animal; y finalmente en el estadio VII, es donde el ovocito ya está maduro (M) y no es posible diferenciar el núcleo, ya que el vitelo llena la mayor parte de la célula, cubriendo la posición de los organelos. Wallace y Selman (1980) también determinaron que *Fundulus heteroclitus* posee un patrón de desarrollo en el ovario de tipo asincrónico, indicando que tienen una época de desove continua durante los meses de mayo a julio. En este trabajo se establecen los criterios para las distintas fases de madurez de los ovocitos en ovarios sincrónicos y asincrónicos.

En un trabajo hecho en mamíferos, se observó que el ovocito y las células de la granulosa asociadas están separados del estroma circundante por una membrana denominada membrana basal. Así, las células de la granulosa se encuentran desprovistas de un aporte vascular directo. La naturaleza avascular del compartimento de las células de la granulosa requiere el contacto de las células vecinas, por lo que, las células de la granulosa presentan interconexiones, lo que da como resultado su acoplamiento, y por lo tanto, un sincicio ampliado, integrado y

funcional. En general, se supone que estas uniones celulares pueden ser importantes en el intercambio metabólico y en el transporte de moléculas pequeñas entre células de la granulosa vecinas. (Yen y Jaffe, 1991, Domínguez et. al.,1991).

Además, las células de la granulosa extienden prolongaciones citoplásmicas con la membrana plasmática del ovocito. Sin duda, este último sistema de comunicación es responsable en gran medida del estricto control ejercido por el cúmulo prolífero sobre la reanudación de la meiosis por el ovocito primario encerrado (*Op. Cit.*)

Se cuenta con trabajos realizados en mamíferos que indican que si bien, existen pocas dudas en cuanto a que la población de células de la granulosa es muy heterogénea y que su nivel de diferenciación está lejos de ser uniforme. Una gran cantidad de datos indican que las células foliculares de la granulosa se encuentran estratificadas de forma que permiten la diferenciación de por lo menos tres poblaciones de células, por consiguiente, las células de la granulosa bien pueden ser las más activas al juzgar por varias medidas funcionales, entre ellas, en la esteroidogénesis, dados sus altos niveles intracelulares de 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, 11-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y citocromo P-450¹². Asimismo, las células de la granulosa parecen tener una abundante cantidad de receptores para la hormona luteinizante (LH). Se dispone de poca información acerca de la importancia de esta estratificación funcional (Yen y Jaffe, 1991) La comprensión más detallada de la naturaleza de esta heterogeneidad, constituye uno de los objetivos principales de la fisiología ovárica contemporánea. (*Op. Cit.*).

Son varios los factores que intervienen en el proceso reproductivo de los peces. Uno de ellos es la percepción de estímulos ambientales, como la cantidad de luz (fotoperíodo), la temperatura, y la época de lluvias, los cuales son registrados por el sistema nervioso. Ello incluye, el paso de la información desde los receptores sensoriales hasta el cerebro, para finalmente llegar al hipotálamo, donde se envían las señales que controlan la actividad de la hipófisis, por medio de las hormonas conocidas como hormonas liberadoras de gonadotropinas (GnRH's). Estas a su vez, estimulan a la hipófisis para liberar a la circulación general, hormonas llamadas gonadotropinas I y II (GtH I y GtH II), cuyo destino es la gónada. Su función es estimular la producción de esteroides sexuales en la misma, que contribuyen junto con las gonadotropinas a la gametogénesis. (Cárdenas, 1996, Jameson, 1988).

Además, Lam (1983) realizó una descripción de los factores ambientales que influyen en la actividad gonadal de los peces, mencionando el fotoperíodo, la temperatura y los factores sociales (se considera que son los factores químicos, feromonas, visuales, audibles, táctiles) como principales inductores de la ovogénesis en los organismos.

La regulación de la ovulación, puede involucrar la acción cooperativa de un número de reguladores ováricos que van desde proteasas, inhibidores de proteasas, progestágenos y otros esteroides, eicosanoides, catecolaminas, y péptidos vasoactivos. Factores que generan

la liberación de un ovocito maduro de su folículo en el ovario (Goetz, 1997).

El tema de la reproducción de peces y los factores que influyen en este proceso están siendo ampliamente estudiados debido a su importancia. Por ejemplo, Tapia (1983) realizó un trabajo para determinar la madurez gonadal y la fecundidad en anchoveta *Engraulis mordax mordax*, con objeto de una mejor administración de la pesca de esta especie. Para este trabajo se realizaron dos colectas de distinta fuente, una del sector comercial y la otra durante un crucero de investigación. El autor aplicó técnicas histológicas para elaborar este trabajo, y determinó cinco distintos tipos de ovocitos (inmaduros, gametogénicos, crecimiento, reproductivo y en desove) según su grado de desarrollo. Concluye que las anchovetas se reproducen todo el año, observándose como la temporada principal, primavera e invierno en hembras; primavera y otoño para machos. La pesquería se sostiene de organismos con longitud patrón promedio de 97.4 mm, encontrando la talla de primera madurez entre los 81-85 mm longitud promedio.

Otro ejemplo de trabajos relacionados al respecto del tema es el de Téllez (1983), quien estudia la biología de los machos de la especie *Chirostoma humboldtianum*, en el embalse de Huapango Estado de México, concluyendo que la etapa de la madurez gonádica es muy amplia durante el año, aunque puede considerarse que los meses de mayo y agosto son, donde se pueden encontrar mayor cantidad de adultos reproductores.

Palacios (1998), realizó una descripción histológica del ciclo ovárico de *Ch. humboldtianum*, en la laguna de Cuitzeo, describiendo el organismo con un tipo de reproducción asincrónico y reportando los siete distintos estadios para el desarrollo de los ovocitos reportados en el trabajo de Wallace y Selman (1980), además de realizar pruebas para lograr reproducir la especie en cautiverio teniendo como resultado, un promedio de 69.22% de fertilización, 86.86% de eclosiones con un porcentaje de sobrevivencia del 82.35%, valor muy alentador para el cultivo de estos organismos.

Otro antecedente de investigaciones realizadas con reproducción en teleósteos, es el trabajo de Arana-Magallon (1999), quien realizó un trabajo acerca de la mortalidad, supervivencia y crecimiento de juveniles de *Ch. jordani*, para intentar su reproducción en cautiverio, obteniendo un desove aproximado de 6,800 huevos, en un estanque protegido y 19,400 en un estanque sin protección. La eclosión fue de casi un 98%, pero obtuvo una supervivencia de 1.026% en alevines, denotando un índice de sobrevivencia muy bajo.

Más acerca del género, es lo propuesto por Méndez-Sánchez y Soto-Galera (1996). Dichos autores ubican sistemáticamente a la especie *Ch. riojai* y realizaron un análisis de los aspectos biológicos, donde observan que es un pez que crece rápido, tiene un tipo de alimentación heterogénea, una temporada de reproducción larga con puestas seriales, producción elevada de óvulos y reclutamiento reproductivo en longitudes y edades pequeñas.

En los aspectos ecológicos determinando algunos espacios donde habita actualmente esta especie, como es la Laguna de Victoria, el embalse Ignacio Ramírez, señalando que han desaparecido muchos de sus hábitats y por lo tanto el pez, que es sensible a cambios en el ambiente, corre el riesgo de extinguirse si el problema de deterioro ambiental continúa en aumento.

Para determinar las características ultraestructurales de los componentes celulares del ovario así como de las células germinales y de la teca y la granulosa, se requiere de la visión detallada que proporciona el microscopio electrónico (Sjöstrand, 1967).

Conocer este tipo de elementos y analizar las relaciones y la manera en que influyen en el sistema que fue descrito, es fundamental para entonces poder manejarlo de la forma más correcta. Además de la importancia de conocer las características reproductoras de esta especie (*Ch. humboldtianum*), para que en un futuro sea posible una explotación del recurso, mucho más racional y productiva, es importante generar y conocer modelos de estudio que podamos utilizar para relacionar características en otros vertebrados. Se ha observado que los peces poseen muchas de las características y también ofrecen muchos aspectos únicos para que los biólogos estudien los factores que intervienen en la reproducción de los peces. (Blázquez, et. al. 1997).

El problema con el estudio del origen y las características de los ovocitos en el ovario es que el detalle celular requiere de una adecuada descripción, misma

que no se puede realizar únicamente con la resolución que provee el microscopio de luz. Solo el microscopio electrónico brinda la adecuada resolución y detalle para describir correctamente, la ovogénesis y foliculogénesis (Grier, 2000).

Esta misma herramienta fue utilizada también por Cruz-Landim y Cruz-Höfling (2001), ellos llevaron a cabo la descripción de un material electrodensito que viaja a través de los espacios intercelulares de las células de la teca y la granulosa hasta el ovocito. Describieron un material de carácter electrodensito que comienza a agregarse desde la fase perinucleolar y finaliza junto con la ovogénesis. Mencionan en su análisis que este material puede ser de origen protéico, a pesar de que una de sus pruebas histoquímicas no dio positivo para grupos amino. Sin embargo, no lograron identificar del todo la naturaleza y el origen de este material.

Objetivo general

Describir la estructura y ultraestructura del ovario de *Chirostoma humboldtianum*.

Objetivos particulares

- Describir y analizar la estructura y ultraestructura del ovario basados en estudios histológicos y de microscopía electrónica.
- Contabilizar los ovocitos en sus diferentes estadios, para establecer la madurez de los organismos.
- Establecer la relación morfológica entre las células foliculares y el ovocito.

Metodología

Los ejemplares de *Chirostoma humboldtianum* se capturaron con ayuda de un chinchorro de 50 m de longitud y 1.5 m de caída. La colecta se realizó en el municipio de San Felipe Tiacaque, Estado de México, ubicado geográficamente entre los 99° 42' 44'' y 99° 42' 15'' de longitud oeste y a los 19° 41' 16'' de latitud norte (CETENAL, 1974). Los organismos que se utilizaron para descripción histológica se fijaron con formol al 4%, y las muestras para microscopio electrónico se fijaron en el lugar de la colecta con paraformaldehído- glutaraldehído al 4% con pH de 7.3 durante 2 hr. Se lavó el tejido con PBS 1:3 (amortiguador de fosfatos salinos). Posteriormente, se llevó a cabo la postfijación del tejido en tetraóxido de osmio. Las colectas se realizaron en los meses de Mayo, Julio y Septiembre del 2000 y Febrero, Marzo, Abril y Agosto del 2001. Se procesaron un total de 47 ovarios.

Para las muestras de ovario que se observaron al microscopio óptico, se utilizó la técnica histológica (Luna, 1968). La cual consistió en deshidratación por medio de alcoholes graduales, infiltración en parafina, inclusión en paraplast.

Los ovarios fueron cortados a 7 micrómetros de grosor por medio de un microtómo rotatorio tipo Minnot, realizando la tinción con Hematoxilina y eosina, ó azul de toluidina y PAS. Las muestras fueron montadas con resina sintética para su posterior observación. Los cortes se revisaron en un microscopio Nikkon.

Los criterios para la identificación de las etapas en las que se encontraban los ovocitos, fueron los referidos por Selman y Wallace (1980).

El procesamiento para microscopía electrónica se llevó a cabo por medio de deshidratación con alcoholes graduados, inclusión en resina (Epon 812). Las muestras fueron cortadas con un ultramicrotomo marca JEOL. Cortes semifinos (1μ) fueron teñidos con azul de toluidina, mientras que cortes finos (600 \AA) fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las observaciones se hicieron en un microscopio electrónico Jeol modelo X100 y un Zeiss modelo EM10c/cr.

Resultados

Descripción histológica

Los ovarios de *Ch. humboldtianum* son órganos pareados, en forma de sacos huecos. El ovario derecho presenta una mayor longitud que el izquierdo. Se encuentran ubicados en la parte dorsal de la cavidad abdominal. Ambos se unen en su región posterior formando un oviducto que desemboca en el ano del pez.

La superficie del ovario muestra plegamientos que se van perdiendo conforme el órgano va madurando. La gónada es de color blanquecino cuando es inmadura, pero conforme madura, adquiere un color negro por la presencia de melanóforos en su superficie.

Observaciones hechas en microscopio de luz, muestran que la pared del ovario está conformada además del epitelio, por melanóforos, tejido conectivo, y fibras de musculatura lisa. La capa de fibras en las etapas tempranas de desarrollo gonadal tienen una apariencia muy gruesa y conforme avanza la gametogénesis, la pared se va adelgazando. Sin embargo, al contabilizar el número de las fibras musculares, se aprecia que la cantidad de células (de 7 a 9) no varía respecto al final de la maduración del ovario. El ovario cuenta con al menos cuatro vasos sanguíneos principales que irrigan todo el órgano.

De acuerdo a los criterios y tipos de desarrollo existentes para el ovario, el de esta especie es de tipo asincrónico, es decir que teóricamente presenta épocas de desove durante todo el año

Después de los conteos hechos para determinar la presencia de las distintas fases de desarrollo, se observó que existe un patrón en el arreglo de los ovocitos.

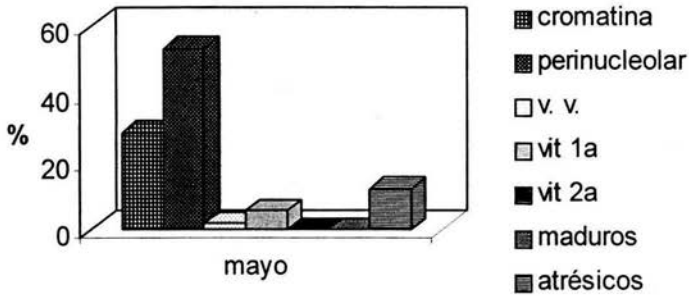
Los ovocitos más inmaduros se encuentran hacia la parte anterior del ovario y los ovocitos vitelogénicos en su mayoría se encontraron en la parte posterior del órgano.

Tabla 1

Población de ovocitos por colecta expresado en porcentaje

	Mayo	Junio	Febrero	Marzo	Abril
CN	28.85	24.15	29.7	17.71	10.65
PN	53.7	58.05	41.3	64.06	67.62
VV	1.85	7.6	7.24	3.12	3.27
Vit. 1^a	5.5	2.54	5.07	5.2	4.91
Vit. 2^a	0	0.14	4.34	4.68	4.09
Maduros	0	6.07	6.5	4.68	4.91
Atrésico	12.03	3.38	5.79	0.52	4.09

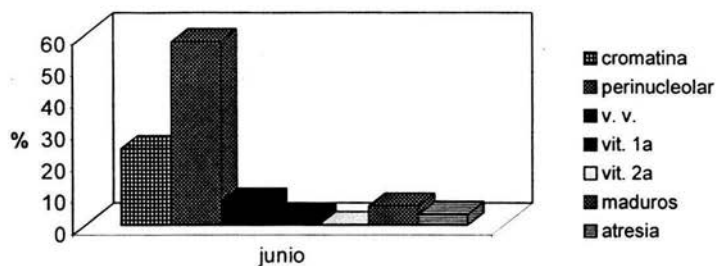
población en mayo



Gráfica 1. Muestra la población de ovocitos en porcentaje en la colecta del mes de mayo del 2000.

Los ovocitos perinucleolares (PN) se encontraron en un porcentaje de 57.78%, los ovocitos en fase de cromatina nucleolar (CN) 28.57%, los ovocitos en vesículas vitelinas (VV) presentaban un porcentaje de 1.92%, en la fase de vitelogénesis primaria (VP) se encontró representado por un 6.33%, los ovocitos que ya se encontraban en atresia (A) o vías de la misma se hallaban en un 13.33%. No se presentaron ovocitos en vitelogénesis secundaria (VS) ni maduros (M) para este mes.

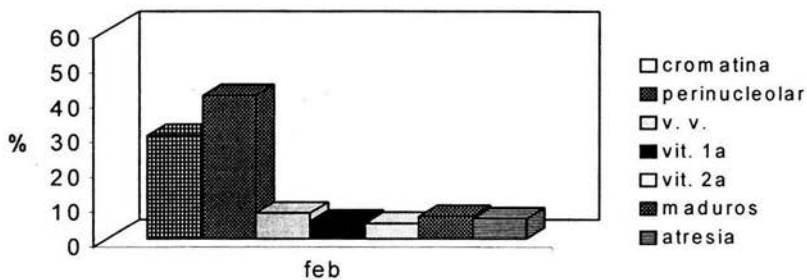
población en junio



Gráfica 2. Muestra la población de ovocitos en porcentaje durante el mes de junio del 2000.

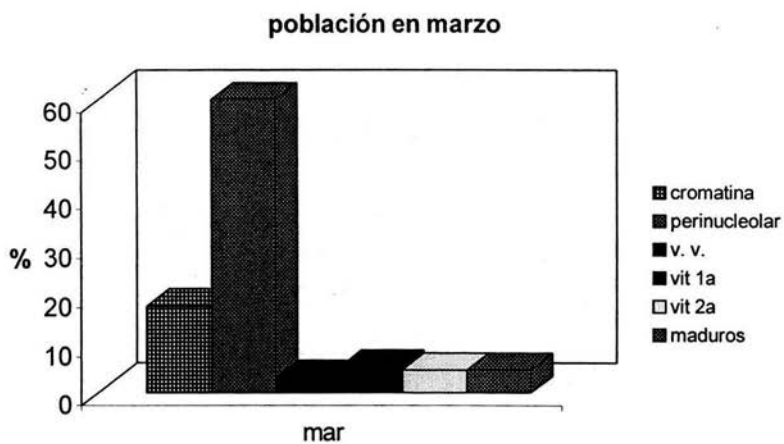
La gráfica correspondiente al mes de Junio muestra un 24.15% en CN, 58.05% para PN, 7.6% VV, 2.54% en VP, 0.14% en VS, 6.07% M y un 3.38% A.

población del mes de Febrero



Gráfica 3. Muestra la población de ovocitos en porcentaje correspondientes al mes de febrero del 2001.

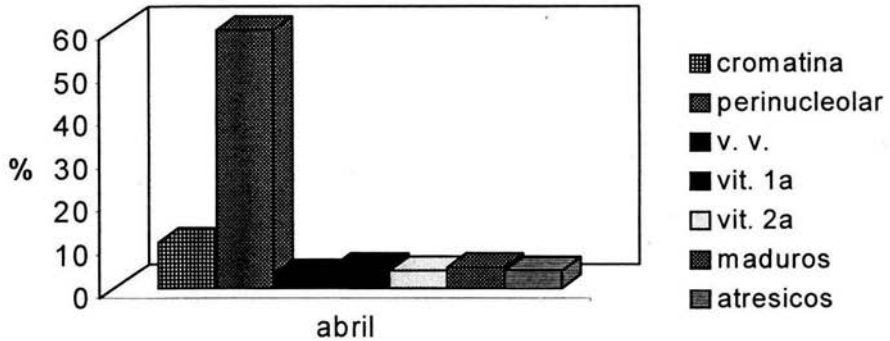
En la gráfica correspondiente a la colecta del mes de febrero el ovario presentaba un 29.7% de ovocitos en CN, 41.3% en PN, 7.24% en VV, 5.07% en VP, 4.34% VS, 6.5% M y 5.79 en A.



Gráfica 4. Muestra la población de ovocitos en porcentaje correspondientes al mes de marzo del 2001.

En la colecta de marzo había 17.71% en CN, 64.06% en PN, 3.12% en VV, 5.2% VP, 4.68% en VS, 4.68% M.

población en abril



Gráfica 5. Muestra la población de ovocitos en porcentaje correspondientes al mes de abril del 2001.

Cada ovocito está rodeado por células foliculares, y conforme el ovocito se va desarrollando se multiplican y forman una capa folicular continua (células de la granulosa). Simultáneamente, los elementos del tejido conectivo del estroma que lo rodean también se organizan para formar las distintas capas externas de la cubierta folicular (células de la teca) y están separadas del ovocito mediante una membrana basal. Así, los ovocitos desde la fase perinucleolar hasta

los estadios vitelogénicos, se encuentran rodeados de una capa interna de la granulosa y una capa externa de la teca. Inmersos en esta estructura folicular, en los cortes histológicos se observan los filamentos que funcionan como ancla cuando el ovocito es ovulado. La capa de la teca contiene fibroblastos, fibras de colágeno, capilares y células de la teca.

e logró determinar por medio de las tinciones (hematoxilina y eosina, azul de toluidina) y la técnica histoquímica de PAS (Reactivo de Schiff) la naturaleza de los componentes en las distintas fases del desarrollo del ovocito.

En cortes de 7 μ teñidos con Hematoxilina y Eosina, el citoplasma de los ovocitos previtelogénicos, y en estadio perinucleolar, es posible apreciar diferencias tonalidades de violeta a morado: dada la etapa de desarrollo en la cual se encuentran estos ovocitos, dicha afinidad por hematoxilina la atribuimos a la cantidad de RNA presente en el citoplasma.

En ovocitos en estadio de vesículas vitelinas, el citoplasma parece desvanecerse por la presencia de este tipo de gránulos, aunque continua presentando preferencia por hematoxilina.

Durante esta etapa, es posible distinguir en las fases finales, vesículas con características diferentes en cuanto al contenido. Una de ellas presenta un material de textura homogénea, con un aspecto que recuerda un coloide, y una segunda clase, en la cual, se presenta un cuerpo denso de forma esférica, que en algunas de las vesículas parece crecer por agregación de cuerpos de apariencia semejante pero de menor tamaño y un tercer y último tipo de vesícula es el que se observo sin ninguna clase de material en su interior,

además de no presentar afinidad por ninguno de los colorantes utilizados para el estudio.

Los cortes (7μ) que fueron teñidos con hematoxilina y eosina, nos permitieron determinar la presencia de riboproteínas y lípidos en el ovocito, así como las capas foliculares, observando que es hasta la fase de vesículas vitelinas donde se puede apreciar, como las riboproteínas llenan por completo el citoplasma del ovocito. Es en esta fase, cuando la aparición de las vesículas, le dan nombre al estadio, y se comienza a agregar material de naturaleza proteica de carácter básico. Ello lo determinamos debido a la tenue afinidad que comienza a mostrar por la eosina, misma que se va incrementando conforme va madurando el ovocito.

los ovocitos en vitelogénesis primaria, en el contorno del núcleo se comienzan a observar proyecciones de la membrana nuclear hacia el citoplasma, los gránulos de vitelo empiezan a aparecer en la periferia del citoplasma; son pequeños y esféricos, éstos están formados de lipoproteínas y algunos carbohidratos, por lo tanto presentan gran afinidad por la eosina. Los gránulos de vitelo incrementan su tamaño y número, durante esta fase fusionándose para formar las plaquetas de vitelo, ocupan las dos terceras partes del citoplasma y tienen afinidad por la hematoxilina.

En los ovocitos en vitelogénesis secundaria en el citoplasma se acumulan rápidamente gránulos de vitelo junto con el crecimiento acelerado de los ovocitos. Al mismo tiempo las vesículas de vitelo se disponen sin arreglo en la

periferia. Después con la desaparición de las vesículas vitelinas, fusión de gránulos de vitelo y agrupamiento de las gotas de aceite da fin a la vitelogénesis.

Inmersos entre las células de la teca y la granulosa se observan cuerpos redondeados con afinidad por la eosina, (estas estructuras son filamentos que posteriormente servirán para que el ovocito pueda adherirse a algún sustrato). En ocasiones el tamaño que puede alcanzar el diámetro de estos filamentos provoca la deformidad tanto del mismo folículo, como del ovocito.

El corion se presenta en dos fases. La diferenciación la realizamos con base a que se aprecian dos distintas intensidades a la hematoxilina, una con mayor afinidad que la otra.

En los cortes semifinos (1μ) con la tinción de azul de toluidina se sugiere la presencia de riboproteínas, y se apreció en la fase de vesículas vitelinas, nuevos componentes que no se observaron en cortes de 7μ . En los ovocitos durante esta fase, desde etapas muy tempranas de desarrollo, se observaron 3 distintas poblaciones de vesículas. Las del primer tipo estaban rellenas de cuerpos esféricos que resultaron positivos tanto al azul de toluidina, como a la tinción del ácido peryodico (PAS) lo que indico que los cuerpos contenidos en estas vesículas, contienen carbohidratos y riboproteinas, a la esfera principal se agrega material de menor tamaño. El segundo tipo de vesículas presenta un contenido más homogéneo y están totalmente llenas de un coloide, positivo a la tinción con azul de toluidina (fig. 2). Y el tercer tipo vesicular no se tiño con ninguno

Falta página

N° 22

En los análisis hechos con ayuda del microscopio electrónico, se observó con mayor detalle el desarrollo de los ovocitos. Donde se aprecian los materiales que conforman a los mismos, que variaban desde muy laxos hasta algunas que eran de carácter electrodensó, muy probablemente se trataba de proteínas. Y una gran cantidad de pequeños cuerpos esféricos que presumiblemente viajaban desde la zona de la teca y la granulosa, hasta el interior del ovocito.

A nivel ultraestructural, en ovocitos en fase de vesículas vitelinas, se aprecian dos diferentes poblaciones, el primer tipo vesicular tiene un material en su interior poco electrodensó al que se le agregan pequeñas esferas de material muy electrodensó. En la periferia de algunas de estas vesículas se pudieron observar otras vesículas mucho más pequeñas y esféricas que de acuerdo a las imágenes, se fusionaban a esta vesícula más grande, vaciando su contenido al interior de la misma apreciado en la Fig. 2.

El segundo tipo vesicular era de un contenido más laxo, con gran homogeneidad que por lo mostrado en las imágenes, al parecer realizaban una fusión entre las vesículas con las mismas características, hasta formar un entramado en todo el ovocito que terminaba por invadir y rellenarlo prácticamente todo el citoplasma.

Se obtuvieron imágenes que muestran la presencia de microvellosidades que se interdigitan entre la teca y la granulosa con el interior del ovocito, desde ovocitos en fase perinucleolar, fase en la cual se comienzan a desarrollar estos canales de comunicación.

Durante las observaciones en microscopio electrónico se pudieron apreciar los complejos sinaptonemales en el núcleo de un ovocito en fase perinucleolar. En el citoplasma de los ovocitos se aprecian organelos, en su mayoría retículo endoplásmico y mitocondrias.

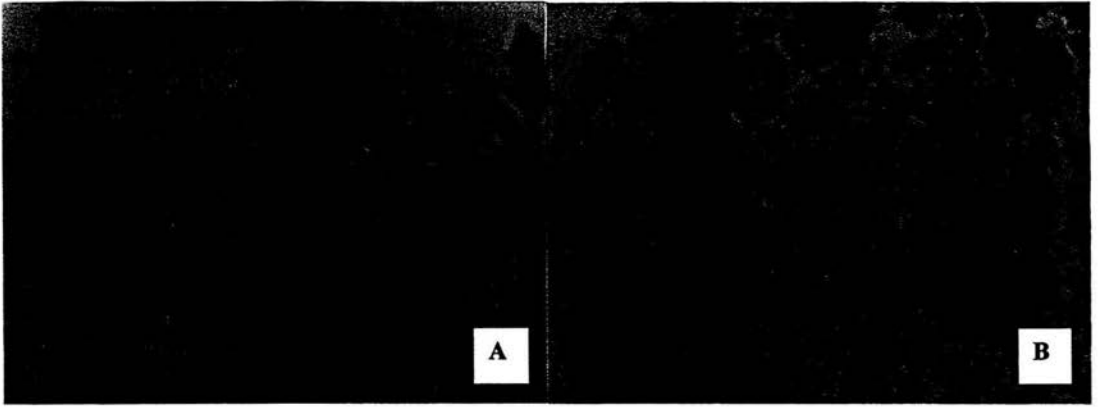


Fig. 1. en la imagen A se aprecia el contenido* de una vesícula, sensible a la reacción con reactivo de Schiff, y señalado con una flecha una vesícula vacía (400X). En la imagen B la reacción en un ovocito en vitelogenésis secundaria, la tinción con azul de toluidina en donde las flechas muestran las tres diferentes poblaciones de vesículas (400X).

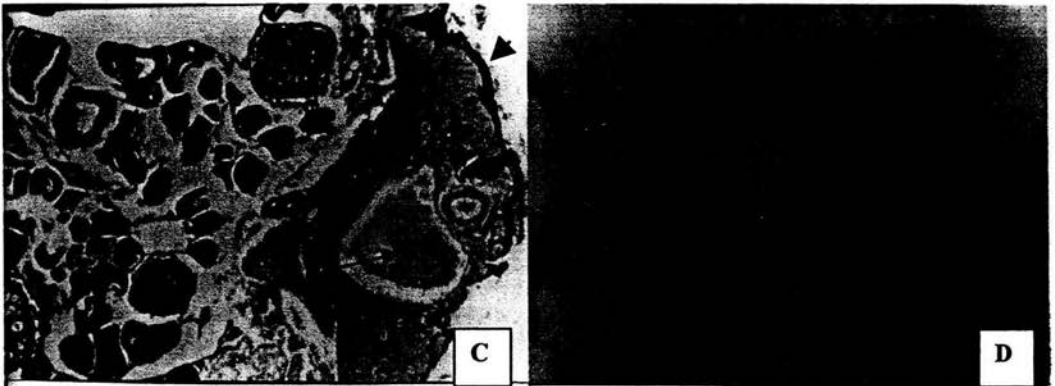


Fig. 2. en la imagen C se observa la pared ovárica compuesta por músculo liso*, y un vaso sanguíneo señalado con una flecha, así como los cromatóforos que tiñen la pared del ovario señalados por una cabeza de flecha, y una población de ovocitos en fases previtelogénicas (50X) D nos muestra una vesícula con un centro esférico al que se le agrega otro tipo de población sin contenido aparente (400X).

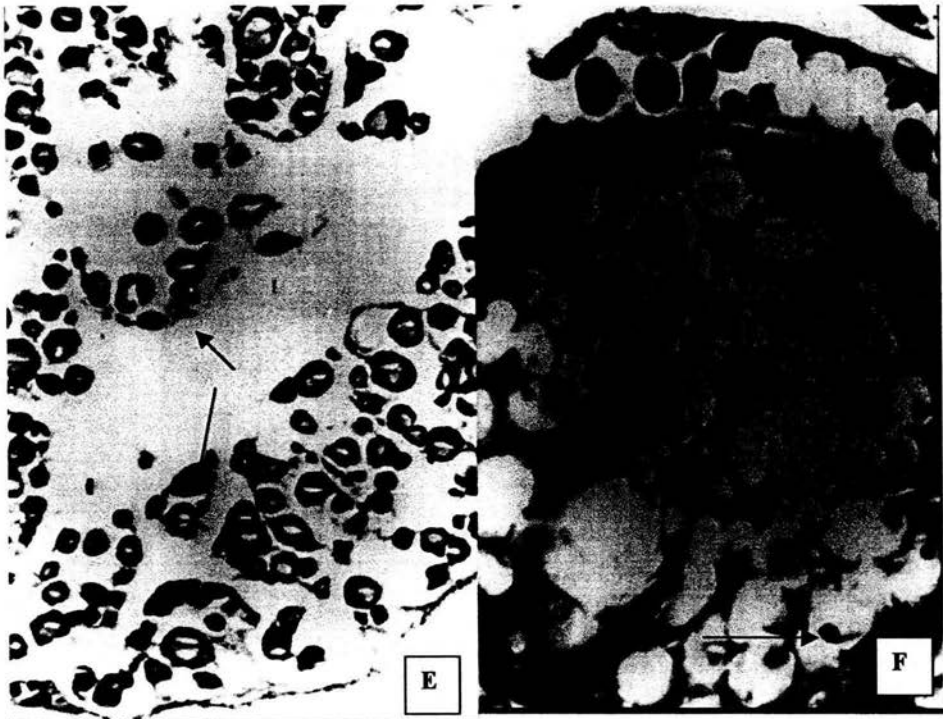


Fig. 3 en la imagen E se aprecia el corte de un ovario donde predomina una población de ovocitos que apenas inician el proceso de desarrollo (50X), y en la F observamos un ovocito en fase temprana de vesículas vitelinas, con gran afinidad a la hematoxilina y en el interior de sus vesículas se distingue un cuerpo esférico, también afín al colorante (200X).

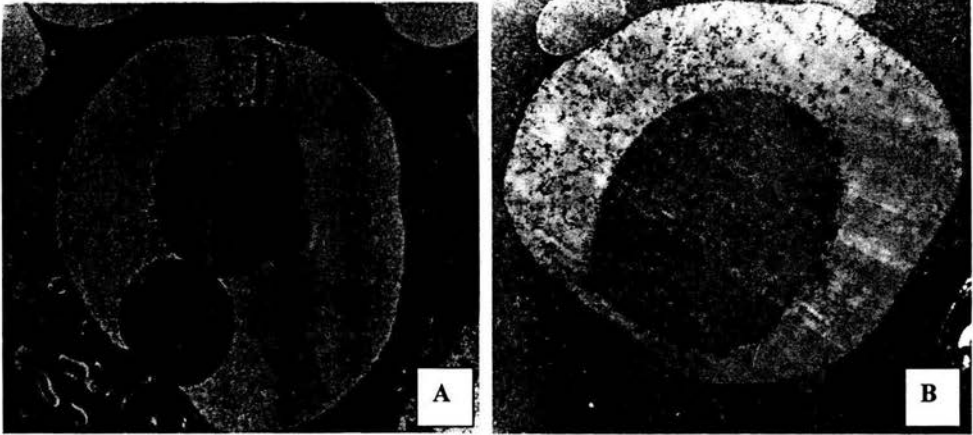


Fig. 4 en la imagen A y B observamos micrografías a 5,000 aumentos de un ovocito en fase de vesículas vitelinas, donde se aprecian vesículas con esferas en su interior, a las cuales se les agrega otro material de menor tamaño con mayor electrodensidad, así como se sugiere la agregación de un material desde el citoplasma al interior de las vesículas.

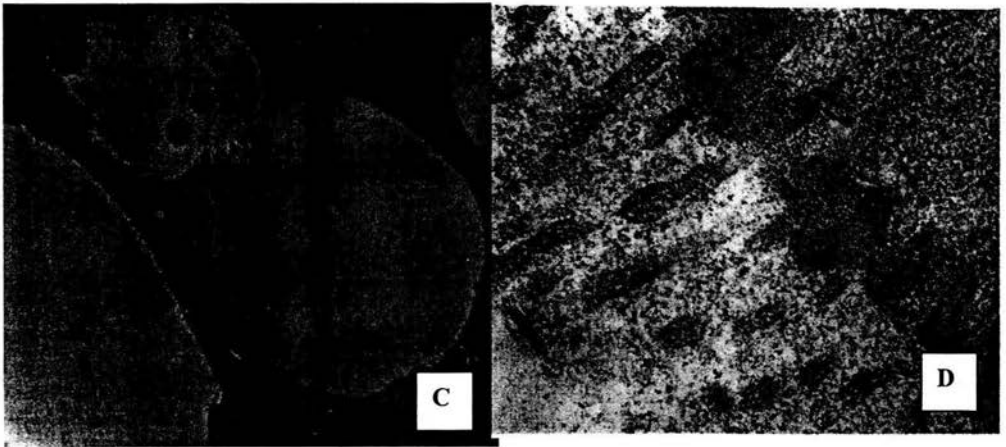


Fig. 5. en la imagen C observamos una micrografía a 5,000 aumentos en donde se observa como dos vesículas están intercambiando materiales laxos. Y en la imagen B observamos a 15,000 aumentos las microvellosidades que aparentemente comunican el interior del ovocito con las células de la teca y la granulosa.

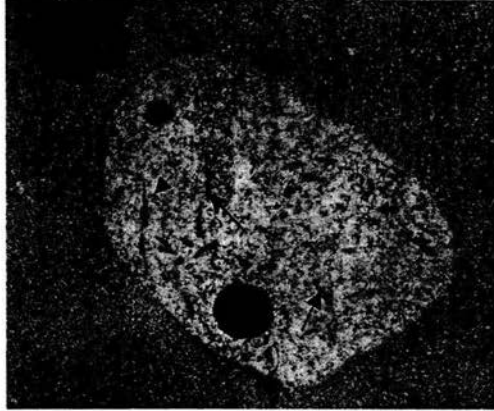


Fig. 6. en esta imagen a 14,000 aumentos que se tomo de un ovocito en fase perinucleolar, apreciamos el núcleo donde se observan complejos sinaptonemáles en meiosis.

Ultraestructura

En los análisis hechos con ayuda del microscopio electrónico, se observó con mayor detalle el desarrollo de los ovocitos. Donde se aprecian los materiales que conforman a los mismos, que variaban desde muy laxos hasta algunas que eran de carácter electrodenso, muy probablemente se trataba de proteínas. Y una gran cantidad de pequeños cuerpos esféricos que presumiblemente viajaban desde la zona de la teca y la granulosa, hasta el interior del ovocito.

A nivel ultraestructural, en ovocitos en fase de vesículas vitelinas, se aprecian dos diferentes poblaciones, el primer tipo vesicular tiene un material en su interior poco electrodenso al que se le agregan pequeñas esferas de material muy electrodenso. En la periferia de algunas de estas vesículas se pudieron observar otras vesículas mucho mas pequeñas y esféricas que de acuerdo a las imágenes, se fusionaban a esta vesícula más grande, vaciando su contenido al interior de la misma apreciado en la Fig. 2.

El segundo tipo vesicular era de un contenido mas laxo, con gran homogeneidad que por lo mostrado en las imágenes, al parecer realizaban una fusión entre las vesículas con las mismas características, hasta formar un entramado en todo el ovocito que terminaba por invadir y rellenarlo prácticamente todo el citoplasma.

Se obtuvieron imágenes que muestran la presencia de microvellosidades que se interdigitan entre la teca y la granulosa con el interior del ovocito, desde ovocitos en fase perinucleolar, fase en la cual se comienzan a desarrollar estos canales de comunicación.

Durante las observaciones en microscopio electrónico se pudieron apreciar los complejos sinaptonemales en el núcleo de un ovocito en fase perinucleolar. En el citoplasma de los ovocitos se aprecian organelos, en su mayoría retículo endoplásmico y mitocondrias.

Análisis de resultados

En el presente trabajo se realizó la descripción histológica del ovario de *Chirostoma humboldtianum* mediante técnicas histológicas e histoquímicas, así como la descripción de la ultraestructura con la observación de muestras en microscopio electrónico.

El conocimiento profundo del desarrollo y características gonadales, es importante para conocer el potencial reproductivo de las especies.

Algunas pesquerías dependen únicamente de la reproducción natural para mantener sus existencias. En tales casos los hábitos reproductivos de las especies cultivadas llevan a la disponibilidad de cantidades adecuadas de ejemplares que pueden ser capturados con fines de reproducción. Para poder aplicar algunas de las técnicas en la acuicultura, como el control hormonal sobre el desove o el control de sexos, así como el empleo de la genética es necesario tener información previa de la biología básica, especialmente de los aspectos reproductivos de la especie que se pretenda cultivar.

Las gónadas femeninas en *Ch. humboldtianum* siguen el patrón ya descrito para la mayoría de los teleósteos (Nagahama, 1983).

Palacios (1998) en su trabajo describió una coloración negra en el ovario durante toda su maduración, en el caso de el cuerpo de agua donde se colectaron nuestros organismos no varía prácticamente en ningún momento del desarrollo del ovario, a excepción de la etapa mas inmadura donde se muestra blanquecino.

Los ovarios son órganos huecos, pareados. El ovario esta compuesto de ovogonias, ovocitos, células foliculares, tejido de sostén o estroma, musculatura, además de vasos sanguíneos, estructuras descritas anteriormente por Harvey (1979) y Palacios (1998).

Aunque existe un estudio previo, similar a este trabajo, de acuerdo a los resultados que se obtuvieron en el presente estudio, existen diferencias significativas, en la dinámica de desarrollo anual, ya que Palacios (1998) describe la primavera, específicamente los meses de abril y mayo como la temporada con poblaciones de ovocitos mas maduros, mientras que en el cuerpo de agua en donde se llevó a cabo este estudio, en los meses de junio del 2000 y febrero, marzo y abril del 2001 fue cuando se encontraron poblaciones de ovocitos maduros, esta diferencia debe ser debido a las condiciones ambientales, como las características fisicoquímicas del agua, altura, temperatura de la zona.

La observación de cortes histológicos del ovario confirmó la presencia de ovocitos en diferentes fases de maduración asincrónico, dato que demuestra la estrategia reproductiva de la especie.

El tamaño de los organismos revisados, fluctuó entre los 8 cm. y los 18 cm. (longitud patrón) hecho que puede ser la causa de los cambios en las características observadas en los cortes, debido a las diferentes etapas de desarrollo en que pudieran encontrarse los organismos utilizados para este trabajo.

El mes de Mayo 2001 fue el que mostró la población más inmadura para el cuerpo de agua y la época en que se realizaron las colectas, ya que en primer término no existían ovocitos completamente vitelogénicos de acuerdo a los criterios de Wallace y Selman (1980). Por el contrario la cantidad de ovocitos en fase cromatina nucleolar es de 28.85%, además de una cantidad de 12.03% en fase de atresia, este alto porcentaje de ovocitos no viables, también pudo deberse a las condiciones ambientales del cuerpo de agua donde fueron colectados los organismos, ya que en esta época, debido a las lluvias, los fertilizantes utilizados en los campos de cultivo, se filtran hasta el cuerpo de agua, situación que altera las condiciones y parámetros normales en que se desarrollan estos organismos.

El mes que presentó el mayor desarrollo en cuanto a la madurez de los ovocitos, fue el mes de junio del 2000 dato que comparado con el mes anterior no indica que la población de peces presentara una maduración ovárica en un mes, sino que existe la probabilidad, que las poblaciones colectadas para el mes de mayo del 2001 sea una distinta a la del mes de junio debido al método de colecta utilizado, junio del 2001 fue el mes donde se contabilizó la mayor cantidad de ovocitos en etapa madura, aunque de igual forma existían grandes cantidades de ovocitos en fase de cromatina nucleolar y perinucleolares, podría interpretarse de acuerdo a lo descrito en las gráficas correspondientes a estos meses, que como en junio del 2001 es en el que se aprecia la mayor cantidad de ovocitos en fase perinucleolar, es entonces este mes el mas inmaduro, pero por el espacio que ocupa un ovocito maduro, casi el total del volúmen del ovario estaba ocupado por ovocitos maduros. Pero por el espacio que ocupa un ovocito maduro dentro del ovario, casi el total del espacio interno y el volúmen del ovario, era dado por estos últimos.

Quizá las distintas poblaciones de vesículas que se describieron, responden a diferentes situaciones que se llevan a cabo durante el proceso de desarrollo del ovocito; una posibilidad es que se trate de un proceso de maduración, mediante la agregación de diferentes materiales que llevan a un tipo vesicular final, que de acuerdo a las imágenes podría ser la conclusión de este desarrollo, la población de vesículas teñidas de azul. Y la otra posibilidad, es que sean tres poblaciones independientes en cuanto al papel que desempeñan en ovocito, posibilidades que quedan a discusión con este trabajo.

Los materiales densos que se depositan, tienden a incrementarse en número conforme va avanzando el desarrollo de los ovocitos, de acuerdo a Cruz-Landim y Cruz-Höfling (2000) se sabe que el vitelo, es sintetizado fuera del ovocito, propiamente en el hígado y que además parte de este material es sintetizado en el epitelio folicular, lo que abre la posibilidad de que el material que observamos en las distintas poblaciones vesiculares de la fase de desarrollo de vesículas vitelinas, tenga estos orígenes.

En cuanto a las pruebas que se realizaron con las diferentes tinciones, se pudo determinar que durante las etapas tempranas de desarrollo del ovocito (cromatina nucleolar y perinucleolar) estos se encuentran muy llenos por estructuras de carácter acidófilos (teñidos por hematoxilina) muy probablemente RNAm, y menor porcentaje RNAt y RNAr, esto debido a la actividad de síntesis de proteínas que se lleva a cabo en estas etapas, y para las fases vitelogénicas cambia el carácter del contenido del ovocito, por un material basófilo (teñido por eosina) probablemente glicoproteínas y vitelo.

Con el azul de toluidina se apreció la presencia de ribonucleoproteínas desde las etapas de cromatina nucleolar y perinucleolar y que continúan sintetizándose durante toda la vitelogénesis.

Con la histoquímica hecha con la técnica de PAS se evidenció la presencia de carbohidratos, probablemente glicoproteínas en las etapas de vesículas vitelinas y hasta la vitelogénesis secundaria. De igual forma, el material observado dentro de las vesículas en las fase de vesículas vitelinas se pinto con la técnica de azul de toluidina.

Los resultados obtenidos y lo ya citado (Palacios, 1998, Tellez, 1983) para este género, indican que este organismo presenta estrategias reproductivas que le permiten en un momento dado reproducirse todo el año, o bien limitar estos periodos a temporadas de reproducción.

Conclusiones

- En el cuerpo de agua donde se llevo a cabo la colecta *Ch. humboldtianum* es una especie que presenta una temporada reproductiva larga durante el año, aunque la temporada mas alta es en el mes de junio.
- De acuerdo a la observación de micrografías, se sugiere que existe una comunicación e intercambio de materiales entre las células de la teca y la granulosa con el ovocitos, debido a la presencia de microvellosidades, que comunican las células foliculares (teca y granulosa) con el interior del ovocito.
- Se determinaron los componentes estructurales, durante las fases de desarrollo del ovocito, con las distintas tinciones utilizadas durante el análisis, estructural del ovario. En la pared del ovario, fibras de musculatura lisa, vasos sanguíneos, fibras de colágena, cromatóforos, en los ovocitos células de la teca y la granulosa, corion, una membrana basal.
- Se describió la dinámica de agregación de estos componentes celulares del ovocito en los periodos de desarrollo del mismo.

Referencias

- Austin, C. R. y Shorts, R. V. Reproducción in Mammals. Libro 7. 1979. primera edición. Impreso en Gran Bretaña. Impreso por el sindicato de la Universidad de Cambridge. P.p. 117-285.
- Blázquez, M. 1997. Fish as Models for Neuroendocrine Regulation of Reproduction and Growth. *Comp. Biochem. and Physiol.* **119**:345-364
- Bon E. Breton B. Govorun M.S. Le Menn F. 1999. Effects of Accelerated Photoperiod Regimes on the Reproductive Cycle of the Female Rainbow Trout: II Seasonal Variations of Plasma Gonadotropins (GTH I and GTH II) Levels Correlated With Ovarian Follicle Growth and Egg Size. *Fish Physiol. Biochem.* **20**: 143-154
- Cárdenas, R. R. Regulación Endocrina de la Reproducción en Peces Oseos. 1996. Ciencia y Desarrollo. P.p. 23-28.
- Cormack, David H, Histología. Novena edición Ed. Harla p.p.764-773.
- Cruz-Landim, C. Cruz-Höfling, M. A. 2001 Ultrastructure of ovarian follicular epithelium of the amazonian fish *Pseudotylorus microps* (Teleostei: Belonidae): morphological and histochemical characterization of the intercellular deposits. *Rev. Brasil. Biol.* **61**: 133-140.
- Davies B., Bromage, N. swanson, P. 1999. The Brain-Pituitary-Gonadal Axis of Female Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*: Effects of Photoperiod Manipulation. *Gen. Comp. Endocrinol.* **115**, 155-166.

- Domínguez R, Chávez R. Cruz, M. E. 1991. Tópicos Selectos en Biología de la Reproducción. La Regulación del Crecimiento y del Desarrollo del Folículo Ovárico. UNAM. P.p. 163-191.
- Grier, H. 2000 Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common snook, *centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). *Journal of endocrinol.* **281**: 243-265.
- Goetz, F. W., Garczynski, M. 1997. The ovarian regulation of ovulation in teleost *Fish Physiol, and Biochem.* **17**: 33-38.
- Harvey J. Brian y Hoar S. William. 1979. Teoría y Práctica de la Reproducción Inducida en los Peces. Centro Internacional Para el Desarrollo. P.p. 7-48
- Hadley, Mac E. 1999. Endocrinology. 4a edición. Ed. Prentice Hall. USA. P.p. 412, 417, 420, 422.
- Kobayashi, M. et.al 1998. Hormone Changes During the Ovulatory Cycle in Goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **69**: 301-307
- Lam T.J. Environmental Influences on Gonadal Activity In Fish. Department of Zoology. National University of Singapore. Singapore.
- Luna, L.G. 1968. Manual of Histologic Staining Methods of the Forces Institute of Pathology. Ed. 3^a. Edit McGraw-Hill. Book Company, New York. P.p. 258.

- Méndez-Sánchez F y Soto -Galera, E. 1996. Peces Dulceacuícolas Mexicanos XIV *Chirostoma riojai* Solorzano y López1965 (Atheriniformes: Atherinidae). *Zoología Informa.* **34**: 49-57.
- Nassauw, Luc van, Tao, Liling, Harrison, Fernand. 1999. Localization of Nitric Oxide-Related Substances in the Quail Ovary During Folliculogenesis. *The Histochemical Journal.* **31**: 443-454.
- Nagahama, Y. 1983. The Functional Morphology of Teleosts Gonads. National Institute for Basic Biology. Okazaki, Japan. *Fish Physiol*, vol. **IXA**.
- Palacios S. María del Carmen. 1999. Ciclo Ovárico y Desarrollo Embrionario del Pez Blanco de Zacapu *Chirostoma humboldtianum* Valenciennes 1835, (Pisces Atherinidae) en Condiciones de Cautiverio. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Sobre Recursos Naturales.
- Prat, F. Zanuy, S. Bromage, N. Y Carrillo, M. 1999. Effects of Constant Short and Long Photoperiod Regimes on the Spawning Performance and Sex Steroid Levels of Female and Male Sea Bass. *J. Fish Biol.* **54**: 125-137.
- Peralta, C.C. 1991. Ciclo Gonádico a Nivel Histológico en Hembras de *Chirostoma estor copandaro* (pescado blanco) en el Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. Tesis profesional. Facultad de Ciencias. UNAM, México, D.F. p.p. 116.
- Santos, J.G. et. al. 1986. Plasma Gonadotropin and Steroid Hormone Profiles During Ovulation in the Carp *Cyprinus carpio*. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.* **52**(7), 1159-1166.
- Sjöstrand, F. S. 1967. *Electron Microscopy of Cells and Tissues.* Academic Press, New York.

- Tapia V. Olivia et. al. Determinación de Madurez Gonadal y Fecundidad en Anchoveta (*Engraulis mordax mordax*) de la Subpoblación Central. Instituto Nacional de la Pesca. 1983.
- Téllez, P.T.A. 1983. Contribución al Conocimiento de la Biología de los Machos del Charal *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes) del Embalse de Huapango, Estado de México. tesis profesional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN. México, D.F. p.p. 36.
- Van Tienhoven. A. Reproductive Phisiology of Vertebrates. Bornell University Press. Londres. 2ª edición. Wallace, R. y Selman, K. 1980. Celular and Dinamics Aspects of Oocytes Growth in Teleosts. *Amer. Zool.*, **21**:325-343.
- Yen, Samuel, S.C. y Jaffe, Robert. 1991. Endocrinología de la Reproducción. Tercera edición. Impreso en Argentina ed. Panamericana. p.p. 205-209