

TESIS DEFENDIDA POR
Sergio Alexandr Castillo Alvarado
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera

Director Interno del Comité

Dr. Roberto Mendoza Alfaro

Director Externo del Comité

Dra. Mónica Hernández Rodríguez

Miembro del Comité

Dr. Benjamín Barón Sevilla

Miembro del Comité

Dra. Sharon Herzka Llona

Miembro del Comité

Dra. Beatriz Cordero Esquivel

*Coordinador del programa de posgrado
en Ciencias en Acuicultura*

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales

Director de Estudios de Posgrado

10 de Febrero de 2012

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE
ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN ACUICULTURA**

**EFECTO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS SOBRE EL DESARROLLO
TEMPRANO DE LOS LEPISOSTEIDOS *Atractosteus spatula* Y *Lepisosteus
oculatus*.**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

SERGIO ALEXANDR CASTILLO ALVARADO

Ensenada, Baja California, México, Febrero del 2012.

RESUMEN de la tesis de **Sergio Alexandr Castillo Alvarado**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en Acuicultura. Ensenada, Baja California. Febrero 2012.

EFFECTO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS SOBRE EL DESARROLLO TEMPRANO DE LOS LEPISTOSTEIDOS *Atractosteus spatula* Y *Lepisosteus oculatus*.

Resumen aprobado por:

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera

Director Interno del Comité

Dr. Roberto Mendoza Alfaro

Director Externo del Comité

El catán (*Atractosteus spatula*) y el pejelagarto pinto (*Lepisosteus oculatus*), miembros de la familia Lepisosteidae, son especies ancestrales y endémicas de gran valor científico y comercial. Por consecuencia, es de vital importancia la elaboración de medidas eficaces para su conservación y aprovechamiento. Como una alternativa para mejorar el cultivo larvario, principal cuello de botella en el proceso de producción acuícola, y conocer más a fondo la fisiología temprana de estas especies, en este trabajo se estudió el efecto de las hormonas tiroideas en el desarrollo larval. Se ha probado que, al ser administradas de manera exógena, estas hormonas provocan efectos benéficos en las larvas de numerosas especies de peces. Con base en esto, el objetivo de este estudio fue evaluar el crecimiento, la supervivencia y el desarrollo de las larvas de estas dos especies de lepisosteidos, después de aplicar hormonas tiroideas mediante dos métodos distintos de administración (inmersión directa de los huevos y transferencia materna). En el caso del catán, se utilizaron huevos fértiles provenientes de un desove único que se organizaron en seis grupos de 200 huevos. Se utilizaron tres réplicas control, y los otros tres se colocaron en agua con la hormona T₃ (1ppm - 2 h). En el pejelagarto pinto, se utilizaron tres hormonas distintas y un control. Las hormonas fueron inyectadas a los reproductores al momento de inducir el desove: T₃ (20 mg/kg), T₄ (20 mg/kg), TSH (4 IU/kg) y DMSO como control (vehículo de inyección). En este caso se indujeron tres desoves por tratamiento. Las larvas se cultivaron en tanques independientes y se alimentaron a saciedad cuatro veces por día (dieta iniciadora comercial) a partir del momento en que inició la alimentación exógena. En el caso del catán se colectaron larvas cada 2 DDE (0, 2, 4, 6, 8 y 10 DDE), mientras que con el pejelagarto se colectaron cada 3 DDE (0, 3, 6, 9, 12 y 15 DDE). Para evaluar el efecto de las hormonas sobre las larvas, se utilizaron índices de condición morfológicos, bioquímicos y moleculares (actividad de enzimas digestivas y relación RNA:DNA). Además se evaluó la concentración

de las hormonas tiroideas (ng/larva o huevo) durante el desarrollo de ambas especies. Ambos métodos de administración de las hormonas tiroideas provocaron un incremento significativo en la concentración de T_3 y T_4 en los huevos de catán y pejelagarto pinto. Entre los efectos provocados por las hormonas tiroideas en las larvas, se apreció un incremento en la tasa de eclosión de los huevos provenientes de hembras inyectadas. Además, se incrementó el metabolismo, la utilización de las reservas vitelinas y el desarrollo de las larvas de ambas especies, ya que se presentó una disminución en el tamaño del saco vitelino y un incremento en el desarrollo de la boca. La actividad de las proteasas alcalinas totales, proteasas ácidas totales, tripsina y leucina-aminopeptidasa en las larvas expuestas a las hormonas tiroideas fue significativamente mayor, lo que indica que estas hormonas aceleran la diferenciación y desarrollo del tracto digestivo en ambas especies. Finalmente, se apreció un incremento en la relación de ácidos nucleicos, lo que refleja el efecto de las hormonas tanto en el metabolismo (síntesis proteica) como en el crecimiento (proliferación celular) de las larvas recién eclosionadas.

Palabras Clave: *Atractosteus spatula*, *Lepisosteus oculatus*, Hormonas Tiroideas.

ABSTRACT of the thesis presented by **Sergio Alexandr Castillo Alvarado** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in Acuicultura. Ensenada, Baja California, México. February 2012.

**EFFECT OF THYROID HORMONES ON EARLY DEVELOPMENT OF GARFISH
Atractosteus spatula AND *Lepisosteus oculatus*.**

The alligator gar (*Atractosteus spatula*) and spotted gar (*Lepisosteus oculatus*), members of Lepisosteidae family, are ancestral and endemic species of great scientific and commercial value, consequently, is of vital importance the development of effective measures for its conservation and subsequent exploitation. As an alternative to improve larval rearing, the main bottleneck in the process of aquaculture production, and learn more about the early physiology of these species, in this work we studied the effect of thyroid hormones in larval development. It has been proven that, when administered exogenously, these hormones cause beneficial effects on the larvae of many fish species. On this basis, the aim of this study was to evaluate the growth, survival and development of larvae of these two Lepisosteidae species, after application of thyroid hormones by two different methods of administration (water bath and maternal injection). In the case of alligator gar, fertile eggs from a single spawning were organized in six groups of 200 eggs. Three control replicates were used, and the other three were placed in a water bath with T₃ hormone (1ppm - 2 h). In the case of spotted gar, three different hormones and a control group were used. Hormones were injected into broodstock at the spawning induction moment: T₃ (20 mg/kg), T₄ (20 mg/kg), TSH (4 IU/kg) and DMSO as control group (injection vehicle). In this case three spawnings were induced by treatment. Larvae were cultured in separate tanks and fed to satiation four times per day (commercial starter diet) from the time when exogenous feeding began. In the case of alligator gar, larvae were collected every two days post hatch (0, 2, 4, 6, 8 y 10 DPH), while spotted gar larvae were collected every three DPH (0, 3, 6, 9, 12 y 15 DPH). To evaluate the effect of hormones on larvae, morphological, biochemical and molecular condition indices were used (activity of digestive enzymes and RNA:DNA rate). We also evaluated the concentration of thyroid hormones (ng/larva or egg) during the development of both species. Both methods of thyroid hormones administration caused a significant increase in the concentration of T₃ and T₄ in alligator and spotted gar eggs. Among the effects caused by thyroid hormones in larvae, there was an increase in hatching rate of larvae that came from injected females. In addition, there was an increase in metabolism, in yolk reserves utilization and larvae development, because we found a decrease in yolk sac size at hatch and a faster mouth development in larvae. The activity of total alkaline proteases, total acid proteases, trypsin and leucine-aminopeptidase in larvae exposed to thyroid hormones was significantly higher, indicating that these hormones accelerate the differentiation and development of the digestive tract in both species. Finally, it was observed an increase in nucleic acids ratio, reflecting the effect of these hormones

in both metabolism (protein synthesis) and growth (cell proliferation) of newly hatched larvae.

Keywords: *Atractosteus spatula*, *Lepisosteus oculatus*, Thyroid Hormones.

Agradecimientos

Al CICESE por sustentar mis estudios de Maestría en Ciencias, dándome la oportunidad de continuar con mi preparación académica.

Al CONACyT por la beca otorgada durante la realización de mis estudios (Registro #23115), además del apoyo económico brindado al proyecto 'Influencia de Hormonas Anabólicas en Reproductores de Catán (*Atractosteus spatula*) y su Repercusión sobre la Sobrevivencia, Desarrollo y Crecimiento de las Larvas' (Proyecto CONACyT Ciencia Básica 103562).

Al Dr. Roberto Mendoza y el Dr. Juan Pablo Lazo por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo, por el inmenso apoyo brindado para la realización del mismo, así como por la inmejorable asesoría y el valioso conocimiento que me aportaron.

Al Dr. Quenton Fontenont, la Dra. Allyse Ferrara y a Kent Bollfrass por recibirme en Thibodaux, Luisiana y ayudarme inmensamente en la elaboración de este estudio, pero más aún por la oportunidad que me brindaron de vivir una experiencia muy valiosa.

A la Dra. Mónica Hernández, la Dra. Sharon Herzka y el Dr. Benjamín Barón por aceptar ser parte de mi comité de tesis y, sobre todo, por sus valiosas observaciones que mejoraron de manera invaluable este trabajo.

Al Dr. Carlos Aguilera y el Dr. Jesús Montemayor, miembros del Laboratorio de Ecofisiología de la UANL, por su experta asesoría e inmenso apoyo brindado en la elaboración del bioensayo y los análisis de laboratorio.

Y finalmente, a mi novia Ana Lucía, a mis primos Wicho y Riki, a mi familia y a mis amigos por su colaboración directa e indirecta en la realización de esta tesis.

Muchas gracias a todos.

CONTENIDO

I. Introducción.....	1
II. Antecedentes	5
II.I. Biología.....	5
II.I.I. Catán (<i>Atractosteus spatula</i>).....	5
II.I.II. Pejelagarto pinto (<i>Lepisosteus oculatus</i>)	5
II.II. Desarrollo embrionario y larval	6
II.III. Hormonas tiroideas	7
II.III.I. Eje tiroideo en peces.....	7
II.III.II. Efecto de las hormonas tiroideas sobre el desarrollo larval	9
II.III.III. Aporte materno de hormonas tiroideas	11
II.IV. Índices de condición e indicadores de desarrollo	13
II.IV.I. Ácidos nucleicos	13
II.IV.II. Actividad de las enzimas digestivas	15
III. Justificación.....	17
IV. Objetivos.....	18
V. Hipótesis	19
VI. Materiales y métodos.....	20
VI.I. Inducción al desove y aplicación de hormonas tiroideas.....	20
VI.I.I. Pejelagarto pinto (<i>Lepisosteus oculatus</i>).....	20
VI.I.II. Catán (<i>Atractosteus spatula</i>)	21
VI.II. Cultivo larvario y método de muestreo	22
VI.II.I. Pejelagarto pinto (<i>Lepisosteus oculatus</i>).....	22
VI.II.II. Catán (<i>Atractosteus spatula</i>)	24
VI.III. Cuantificación de hormonas tiroideas	24
VI.IV. Actividad de las enzimas digestivas	25
VI.IV.I. Obtención del extracto enzimático	25
VI.IV.II. Cuantificación de proteína soluble	26
VI.IV.III. Actividad proteolítica alcalina total	26

VI.IV.IV. Actividad proteolítica ácida total	27
VI.IV.V. Actividad tipo tripsina	27
VI.IV.VI. Actividad tipo leucina-aminopeptidasa.....	27
VI.IV.VII. Cuantificación de la actividad	28
VI.V. Análisis de ácidos nucleicos	29
VI.VI. Análisis estadístico	31
VII. Resultados.....	32
VII.I. Cuantificación de hormonas tiroideas	32
VII.I.I. Catán	32
VII.I.II. Pejelagarto pinto.....	34
VII.II. Reproducción, condición morfológica y supervivencia	36
VII.II.I. Catán	36
VII.II.II. Pejelagarto pinto.....	39
VII.III. Actividad de las enzimas digestivas	43
VII.III.I. Catán	43
VII.III.II. Pejelagarto pinto.....	49
VII.IV. Cuantificación de ácidos nucleicos	54
VII.IV.I. Catán.....	54
VII.IV.II. Pejelagarto pinto	56
VIII. Discusión	59
VIII.I. Fisiología tiroidea en catán y pejelagarto pinto	59
VIII.II. Efecto de las hormonas tiroideas en catán y pejelagarto pinto	64
VIII.II.I. Reproducción, morfología y supervivencia	64
VIII.II.II. Actividad de las enzimas digestivas	71
VIII.II.III. Relación de ácidos nucleicos	76
IX. Conclusiones	81
X. Literatura Citada	84

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Eje tiroideo en los peces (Eales y Brown, 1993).	9
2	Diseño experimental utilizado para evaluar el efecto de las hormonas tiroideas sobre el desarrollo temprano del pejelagarto pinto.	21
3	Diseño experimental utilizado para evaluar el efecto de las hormonas tiroideas sobre el desarrollo temprano del catán.	22
4	Metodología utilizada para la extracción de hormonas tiroideas (Kobuke <i>et al.</i> , 1987).	25
5	Metodología utilizada para la cuantificación de ácidos nucleicos (Kaplan <i>et al.</i> , 2001).	30
6	Concentración (ng/huevo o larva) de la hormona T ₃ en huevos y larvas de catán provenientes del tratamiento control y del tratamiento en que los huevos fueron expuestos a la hormona T ₃ . El (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, p<0.05).	32
7	Concentración (ng/huevo o larva) de la hormona T ₄ en huevos y larvas de catán provenientes del tratamiento control y del tratamiento en que los huevos fueron expuestos a la hormona T ₃ . El (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, p<0.05).	33
8	Concentración (ng/huevo o larva) de la hormona T ₃ en huevos y larvas de pejelagarto pinto provenientes del tratamiento control y de los tratamientos con hormonas tiroideas.	34
9	Concentración (ng/huevo o larva) de la hormona T ₄ en huevos y larvas de catán del tratamiento control y de los tratamientos con hormonas tiroideas. El (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, p<0.05).	35

10	Tamaño relativo del saco vitelino (%) en relación a la longitud total de larvas de catán expuestas a la hormona T ₃ en comparación con el tratamiento control. El (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (Anova, p<0.05).	36
11	Longitud total (mm) de larvas de catán expuestas a la hormona T ₃ en comparación con el tratamiento control.	37
12	Tasa de crecimiento (mm/día) de las larvas de catán expuestas a la hormona T ₃ en comparación con el tratamiento control. Se consideran periodos de dos días.	38
13	Longitud del hocico en relación a la longitud total (%) durante el desarrollo de larvas de catán expuestas a la hormona T ₃ en comparación con el tratamiento control. El (*) indica diferencia significativa entre los tratamientos (Anova de 2 vías, p<0.05).	39
14	Longitud total (mm) de larvas de pejelagarto pinto provenientes de hembras inyectadas con hormonas tiroideas (T ₃ , T ₄ y TSH) en comparación con el tratamiento control.	41
15	Tasa de crecimiento (mm/día) en larvas de pejelagarto pinto provenientes de hembras inyectadas con hormonas tiroideas (T ₃ , T ₄ y TSH) en comparación con el tratamiento control, para intervalos de tres días.	41
16	Longitud relativa del hocico de larvas del pejelagarto pinto (%) provenientes de hembras inyectadas con hormonas tiroideas (T ₃ , T ₄ y TSH) en comparación con el tratamiento control.	42
17	Índice de supervivencia en inanición (%) de larvas de pejelagarto pinto provenientes de hembras inyectadas con hormonas tiroideas (T ₃ , T ₄ y TSH) en comparación con el tratamiento control.	43
18	Actividad proteolítica alcalina total durante el desarrollo de larvas de catán expuestas a la hormona T ₃ en comparación con el tratamiento control. (A) Actividad total (U/larva); (B) Actividad específica (U/mgP). El (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, p<0.05).	45

- 19 Actividad proteolítica ácida total durante el desarrollo de larvas de catán expuestas a la hormona T_3 en comparación con el tratamiento control. (A) Actividad total (U/larva); (B) Actividad específica (U/mgP). El (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, $p < 0.05$).. 46
- 20 Actividad tipo tripsina durante el desarrollo de larvas de catán expuestas a la hormona T_3 en comparación con el tratamiento control. (A) Actividad total (U/larva); (B) Actividad específica (U/mgP). El (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, $p < 0.05$). 47
- 21 Actividad tipo leucina-aminopeptidasa durante el desarrollo de larvas de catán expuestas a la hormona T_3 en comparación con el tratamiento control. (A) Actividad total (U/larva); (B) Actividad específica (U/mgP). El (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, $p < 0.05$). 48
- 22 Actividad proteolítica alcalina total durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto provenientes de hembras inyectadas con hormonas tiroideas (T_3 , T_4 y TSH) en comparación con el tratamiento control. (A) Actividad total (U/larva); (B) Actividad específica (U/mgP). Distintos superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, $p < 0.05$). 50
- 23 Actividad proteolítica ácida total durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto provenientes de hembras inyectadas con hormonas tiroideas (T_3 , T_4 y TSH) en comparación con el tratamiento control. (A) Actividad total (U/larva); (B) Actividad específica (U/mgP). 51
- 24 Actividad tipo tripsina durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto provenientes de hembras inyectadas con hormonas tiroideas (T_3 , T_4 y TSH) en comparación con el tratamiento control. (A) Actividad total (U/larva); (B) Actividad específica (U/mgP). Distintos superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, $p < 0.05$). 52
- 25 Actividad tipo leucina-aminopeptidasa durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto provenientes de 53

- hembras inyectadas con hormonas tiroideas (T_3 , T_4 y TSH) en comparación con el tratamiento control. (A) Actividad total (U/larva); (B) Actividad específica (U/mgP). Distintos superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, $p < 0.05$).
- 26 Relación RNA:DNA durante el desarrollo de larvas de catán expuestas a la hormona T_3 en comparación con el tratamiento control. El (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, $p < 0.05$). 54
- 27 Relación DNA:Peso Seco durante el desarrollo de larvas de catán expuestas a la hormona T_3 en comparación con el tratamiento control. El (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, $p < 0.05$). 55
- 28 Relación RNA:Peso Seco durante el desarrollo de larvas de catán expuestas a la hormona T_3 en comparación con el tratamiento control. El (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, $p < 0.05$). 55
- 29 Relación RNA:DNA durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto provenientes de hembras inyectadas con hormonas tiroideas (T_3 , T_4 y TSH) en comparación con el tratamiento control. Distintos superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, $p < 0.05$). 57
- 30 Relación RNA:Peso Seco durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto provenientes de hembras inyectadas con hormonas tiroideas (T_3 , T_4 y TSH) en comparación con el tratamiento control. Distintos superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, $p < 0.05$). 57
- 31 Relación DNA:Peso Seco durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto provenientes de hembras inyectadas con hormonas tiroideas (T_3 , T_4 y TSH) en comparación con el tratamiento control. Distintos superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, $p < 0.05$). 58

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Efecto de las hormonas tiroideas sobre el desarrollo larval de los peces.	10
II	Concentración de hormonas tiroideas provenientes de la madre en extractos de huevos fertilizados de diferentes especies de peces.	12

I. Introducción

Los catanes o peces lagarto son organismos pancrónicos que cuentan con estructuras ancestrales (vertebras opistocélicas, escamas ganoideas, etc.) presentes en organismos extintos. Las primeras especies aparecieron en el Periodo Cretácico, hace 180 millones de años, y florecieron en casi todo el mundo. Actualmente, solo subsisten siete especies agrupadas en dos géneros, todos dentro de la familia Lepisosteidae y que se localizan únicamente en Norte y Centro América y en el Caribe (Contreras y Ruiz, 2010).

Estos peces son carnívoros, por lo que están dotados de varias filas de dientes fuertes. Se caracterizan por su cuerpo y hocico alargado, además de que están cubiertos por gruesas escamas romboidales, lo que les da una apariencia muy similar a la de un lagarto (Contreras y Ruiz, 2010; Burr y Page, 2011).

El catán (*Atractosteus spatula*) es el pez de agua dulce de mayor tamaño que habita las aguas continentales de México. Se localiza en las vertientes del Golfo de México, específicamente en los estados de Tamaulipas y San Luis Potosí, así como en la cuenca del río Mississippi en EUA. Se diferencia de las demás especies de lepisosteidos por su tamaño, pudiendo alcanzar más de dos metros de longitud, y por tener un hocico más ancho y corto (Mendoza *et al.*, 2002; Contreras y Ruiz, 2010; Burr y Page, 2011).

El pejelagarto pinto (*Lepisosteus oculatus*) es más pequeño que el catán, mide en promedio ochenta centímetros de longitud, tiene un hocico más alargado, y se caracteriza por contar con manchas oscuras en todo el cuerpo. Se distribuye a lo largo del este de EUA, desde los Grandes Lagos hasta la cuenca del río Mississippi (Contreras y Ruiz, 2010; Burr y Page, 2011).

Estos peces son importantes desde el punto de vista científico y comercial, al tratarse de organismos ancestrales, son especies clave en los estudios de fisiología evolutiva. Además, desde una perspectiva comercial, son especies importantes para la pesca deportiva, son valoradas como producto alimenticio

debido a la calidad de su carne, e incluso tienen un valor tradicional ya que sus escamas se utilizan como producto artesanal (Mendoza *et al.*, 2002; Mendoza *et al.*, 2008a).

En EUA las poblaciones de catán y pejelagarto pinto se encuentran amenazadas, mientras que en México los volúmenes de captura del catán han disminuido de manera crítica debido a la sobreexplotación del recurso y la alteración de su hábitat natural (Ferrara, 2001; Aguilera *et al.*, 2002; SEMARNAT, 2004; Mendoza *et al.*, 2008a). En consecuencia, es de vital importancia el estudio de medidas eficaces para la conservación de ambas especies y su posterior aprovechamiento, tanto pesquero como acuícola (Mendoza *et al.*, 2002).

Para lograr lo anterior, se han desarrollado diversos estudios enfocados en obtener una mayor producción de crías por año, ya que esta etapa del cultivo es el principal cuello de botella en el proceso de producción acuícola de los lepisosteidos (Mendoza y Aguilera, 2001; Mendoza *et al.*, 2002).

Como una alternativa para conocer más a fondo la fisiología del desarrollo temprano de estas especies y por consiguiente contar en un futuro con cultivos larvarios más exitosos, en este trabajo de tesis se estudió el efecto de las hormonas tiroideas sobre el desarrollo temprano de las larvas. Estas hormonas tienen un papel muy importante en el desarrollo y la metamorfosis de todos los vertebrados, y se ha demostrado que al ser administradas de manera exógena, provocan un incremento significativo en el crecimiento, el desarrollo y la supervivencia de larvas de numerosas especies de peces (Brooks *et al.*, 1997; Power *et al.*, 2001).

La fisiología del eje tiroideo en los peces ancestrales, como es el caso de los lepisosteidos, es prácticamente desconocida (Youson, 2007). La única información reportada para cualquier especie de pez lagarto fue proporcionada por Mendoza *et al.* (2002), quienes en un estudio con el catán, aplicaron estas hormonas en las larvas y observaron los primeros indicios de un efecto sobre el desarrollo. Sin embargo, el bioensayo fue de corta duración y se presentaron problemas de mortalidad elevada en algunos tratamientos, por lo que surgió la

necesidad de realizar un nuevo estudio abordando distintos métodos de administración de estas hormonas para conocer su papel en el desarrollo de las larvas de estas especies.

Debido a que las hormonas tiroideas provocan un efecto positivo en el desarrollo temprano de distintas especies de peces, y ante la importancia de conocer la fisiología básica de estas hormonas en los lepisosteidos, era importante elucidar si al administrarlas en etapas tempranas, se mejoraría el desarrollo de las larvas y por consecuencia se incrementaría la tasa de supervivencia en los cultivos. Esta hipótesis tiene como base la teoría conocida como “programación metabólica” (Conceicao *et al.*, 2009), la cual propone que los estímulos fisiológicos a inicios del desarrollo, además de provocar un efecto inmediato en el metabolismo, también estimulan la expresión de ciertos genes que provocan cambios fisiológicos de largo plazo en los organismos.

Así, por medio del análisis de la expresión genética se ha comprobado que, durante el desarrollo embrionario, los peces ya cuentan con la maquinaria regulatoria necesaria para la señalización y la activación de las hormonas tiroideas. Concretamente, se ha detectado la expresión de receptores celulares específicos para las hormonas tiroideas, los cuales son responsables de enviar la señal nuclear que inicia la transcripción de proteínas específicas en el embrión (Walpita *et al.*, 2007).

Es importante mencionar que el hecho de que los embriones sean capaces de utilizar las hormonas tiroideas, no significa necesariamente que sean capaces de sintetizarlas. Estudios sobre la ontogenia del sistema endocrino indican que las larvas de peces recién eclosionadas no son capaces de producir sus propias hormonas, por lo que dependen de fuentes exógenas. En efecto, se ha demostrado que las hormonas tiroideas, entran al ovocito de los peces a través de la circulación materna, creando una reserva que cumple hasta cierto grado con las necesidades regulatorias del crecimiento, desarrollo, osmoregulación, respuesta al estrés y otras funciones fisiológicas de las larvas (Lam, 1994; Brooks *et al.*, 1997).

Existen dos métodos para la administración de las hormonas tiroideas. Se pueden disolver en el agua para ser aplicadas de manera directa a los huevos y/o larvas, o se pueden suministrar a las hembras en estado reproductivo. Existe evidencia de que durante el proceso de vitelogénesis, estas hormonas se transfieren a los huevos, contribuyendo a acelerar la diferenciación y el desarrollo del embrión (Greenblatt *et al.*, 1989; Lam, 1994).

Conocer el efecto de las hormonas tiroideas en el desarrollo temprano de las larvas no solo ayudará a mejorar el cultivo larvario de estas especies, sino que además permitirá evaluar la importancia de estas hormonas en la reproducción y su aporte materno, lo que sentará las bases para realizar un mejor manejo de los reproductores.

Otro punto importante a resaltar es que si bien el desarrollo larvario del catán ha sido ampliamente estudiado durante los últimos años (Aguilera *et al.*, 2002; Mendoza *et al.*, 2008a), aún falta mucho por conocer acerca del desarrollo temprano del pejelagarto pinto, por lo que las investigaciones de este tipo ponen a esta especie en perspectiva para ser considerada dentro de la acuicultura.

Con base en lo anterior, el propósito de este estudio fue evaluar el crecimiento, la supervivencia y el desarrollo de las larvas de estas dos especies de lepisosteidos, después de aplicar hormonas tiroideas mediante los métodos de administración descritos anteriormente (directo en el agua y transferencia materna) para evaluar cuál de estas metodologías produce los mejores resultados en las diferentes variables de respuesta.

Con el fin de estimar la condición y el grado de desarrollo de las larvas, se evaluaron distintas variables morfológicas, además de cuantificar distintos índices de condición a partir de la concentración de ácidos nucleicos totales y la actividad de enzimas digestivas.

II. Antecedentes

II.I. Biología

II.I.I. Catán (*Atractosteus spatula*)

El catán (*A. spatula*) es un pez cuya distribución se restringe a los ríos costeros de Florida, el Valle de Mississippi y el norte de México (Tamaulipas, San Luis Potosí y Veracruz), aunque aún existen algunas poblaciones en cuerpos de agua de los estados de Oklahoma, Arkansas, Luisiana y Texas, EUA. Es una especie dulceacuícola que habita preferentemente en ambientes de poca profundidad y mucha vegetación, aunque no es raro encontrarlos en aguas salobres o marinas, e incluso tiene la capacidad de tomar aire de la superficie, lo cual le permite sobrevivir en ambientes anóxicos (Ferrara, 2001; Brinkman, 2003; Schultz, 2004).

Su cuerpo es largo, cilíndrico, de color verde olivo y está cubierto por gruesas escamas romboidales. Se distingue de las demás especies de la familia Lepisosteidae por las dos hileras de dientes que se encuentran en la mandíbula superior, además del gran tamaño que alcanzan en el estadio adulto que es de más de dos metros de longitud promedio (Carlander, 1969; Schultz, 2004).

Es un organismo piscívoro que, a pesar de ser catalogado como depredador voraz, es selectivo en cuanto a las presas que consume, y cuya preferencia alimenticia son los peces de aletas suaves menores a 10 cm (Goodyear, 1967; Schultz, 2004). La reproducción se presenta en la época de primavera-verano, y las hembras son capaces de producir hasta 4,000 huevos/kg que se adhieren a la vegetación y rocas (Schultz, 2004).

II.I.II. Pejelagarto pinto (*Lepisosteus oculatus*)

El pejelagarto pinto se distribuye desde los Grandes Lagos y regiones altas del río Mississippi, a través de Ohio y Missouri hasta la cuenca del río Mississippi en los estados de Luisiana, Texas y Mississippi, EUA. Es un pez estrictamente

dulceacuícola que prefiere hábitats lénticos con vegetación enraizada y flotante. Es de hábitos nocturnos y se encuentra principalmente en aguas de baja profundidad asociado a la vegetación (Love, 2004; Contreras y Ruiz, 2010).

Esta especie cuenta con un cuerpo alargado y cilíndrico, y alcanza una talla máxima de 80 cm. Tiene un hocico medianamente alargado y, a diferencia del catán, solo tiene una hilera de dientes. Su cabeza y cuerpo están cubiertos por numerosos lunares y manchas oscuras (Love, 2004; Contreras y Ruiz, 2010).

A edad temprana, se alimenta de crustáceos, insectos y peces pequeños, pero al crecer es predominantemente piscívoro. Su temporada de reproducción inicia en el mes de marzo y termina en junio. El desove ocurre en aguas superficiales con abundante vegetación enraizada. Generalmente una hembra grande es acompañada de tres machos de menor tamaño. Se consideran desovadores parciales cuya fecundidad promedio es de 5,000 huevos por temporada reproductiva (Love, 2004; Contreras y Ruiz, 2010).

II.II. Desarrollo embrionario y larval

En el caso del catán, el período de incubación depende de la temperatura, a 28°C es de aproximadamente 50 horas. Los huevos que se adhieren al sustrato, cuentan con un amplio espacio perivitelino y tienen un diámetro promedio de 3-4 mm. Las larvas al momento de la eclosión tienen 8 mm de longitud total, cuentan con un saco vitelino voluminoso y un disco suctorial en la parte ventral de la boca con el que se adhieren a la vegetación hasta que consumen el vitelo (4-6 día después de la eclosión). El desarrollo de las larvas es rápido una vez que inicia la alimentación exógena (Aguilera *et al.*, 2002).

En el caso específico del catán, para el décimo día después de la eclosión (DDE) las larvas alcanzan 23 mm de longitud total, adquiriendo la forma alargada característica de los adultos. A partir de este momento, la tasa de crecimiento se incrementa y para los 15 DDE las crías llegan a medir 48 mm de longitud total (Aguilera *et al.*, 2002).

Las larvas de catán presentan un desarrollo muy acelerado, caracterizado principalmente por un tracto digestivo completamente diferenciado cuando inicia la alimentación exógena (5 DDE) (Mendoza y Aguilera, 2008). La formación del tracto digestivo, descrita mediante cortes histológicos, muestra que a los 3 DDE el intestino es recto y está formado por un epitelio simple localizado entre el saco vitelino y la base de la columna vertebral. La diferenciación inicia en el intestino posterior con la formación de la válvula espiral. A los 6 DDE se pueden apreciar el estómago, la válvula espiral y el tejido pancreático, y aún es posible observar reservas de vitelo (Mendoza *et al.*, 2002).

En el caso del pejelagarto pinto, el desarrollo larval aún no se ha estudiado a profundidad. En 1991, Simon y Tyberghein realizaron un estudio morfológico del desarrollo temprano de esta especie, en el que reportan una tasa de crecimiento de 0.83 mm/día.

II.III. Hormonas tiroideas

II.III.I. Eje tiroideo en peces

La glándula tiroides es un órgano que se ha implicado en la regulación de diversos procesos fisiológicos en distintos vertebrados, debido en gran parte a la síntesis y liberación de dos hormonas: 3,5'-tetrayodo-L-tironina (T_4) y la 3,5,3'-triiodo-L-tironina (T_3). La tiroides se encuentra en todos los vertebrados, pero a diferencia de los mamíferos, en los peces la glándula tiroides no está encapsulada, sino que consiste de pequeños folículos tiroideos compuesto por una sola capa de células epiteliales dispersos a lo largo de la arteriola eferente (Yamano, 2005).

La síntesis de las hormonas tiroideas ocurre en el folículo tiroideo, siendo la T_4 la hormona predominante (Figura 1). La liberación puntual de T_4 está propiciada por la hormona estimulante de la tiroides (TSH, por sus siglas en inglés), la cual a su vez es sintetizada y liberada bajo el estímulo de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH, por sus siglas en inglés) de origen hipotalámico. La T_4 tiene pocas funciones directas y se considera que actúa principalmente como un

precursor de la T_3 , la forma biológicamente activa de la hormona. Esta conversión extratiroidea de T_4 a T_3 ocurre cuando la enzima 5'-monodesiodinasa remueve una unidad yódica del anillo exterior de T_4 (Eals y Brown, 1993; Power *et al.*, 2001; Yamano, 2005).

Las hormonas tiroideas circulan en el plasma unidas a proteínas de unión ("*binding proteins*"). En el caso de los peces, lipoproteínas de alta densidad juegan un papel importante en el transporte de estas hormonas (Babin, 1992). La acción de las hormonas tiroideas está mediada por su unión con receptores nucleares específicos. Estos receptores actúan como factores de transcripción que incrementan o disminuyen la expresión de genes que codifican proteínas responsables de la respuesta celular (Yen y Chin, 1994; Wu y Koenig, 2000).

La regulación de los niveles de estas hormonas, y por ende de su actividad biológica, se da por medio de una deiodinización provocada por enzimas específicas que actúan a nivel del hígado, riñón, cerebro y músculos (Eales y Brown, 1993; Finnson *et al.*, 1999).

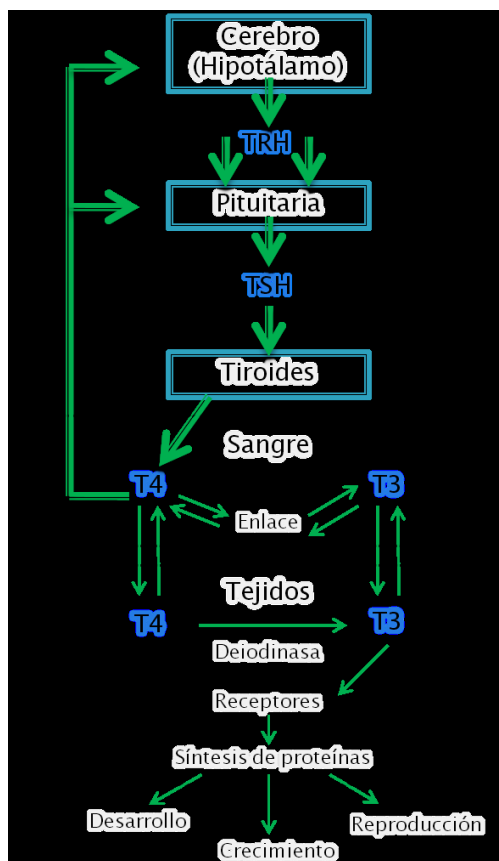


Figura 1. Eje tiroideo en los peces (Eales y Brown, 1993).

II.III.II. Efecto de las hormonas tiroideas sobre el desarrollo larval

Las hormonas tiroideas han demostrado tener un papel importante en el desarrollo temprano de los peces (Brooks *et al.*, 1997; Power *et al.*, 2001). La manipulación experimental de los niveles de estas hormonas influye directamente sobre el crecimiento, desarrollo y supervivencia de las larvas de numerosas especies de peces (Tabla I).

Tabla I. Efecto de las hormonas tiroideas sobre el desarrollo larval de los peces.			
Especie	Hormona(s)	Efecto	Referencia
Tilapia (<i>Sarotherodon mossambicus</i>)	T ₃	Aceleración del desarrollo y aumento en la supervivencia.	Lam <i>et al.</i> , 1980.
Lenguado (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	T ₄	Acelera la metamorfosis y el crecimiento.	Inui y Miwa, 1985.
Salmónidos (<i>Oncorhynchus kisutch</i> , <i>Salmo salar</i> , <i>O. keta</i> y <i>O. tshawytscha</i>)	T ₃ y T ₄	Diferenciación precoz de la pared abdominal del cuerpo.	Sullivan <i>et al.</i> , 1987.
Robalo rayado (<i>Morone saxatilis</i>)	T ₃	Mayor inflamamiento de la vejiga natatoria. Incremento de supervivencia en larvas.	Brown <i>et al.</i> , 1989.
Lenguado (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	TSH	Induce a clímax metamórfico tempranamente debido a la estimulación de hormonas tiroideas.	Inui <i>et al.</i> , 1989.
Pez conejo (<i>Siganus guttatus</i>)	T ₃ y T ₄	Efectos benéficos en el crecimiento y desarrollo de larvas.	Ayson y Lam, 1993.
Robalo rayado (<i>Morone saxatilis</i>)	T ₃	Aumenta el grosor de la capa muscular del estómago de larvas. Mayor supervivencia.	Huang <i>et al.</i> , 1996.
Jurel (<i>Seriola lalandi</i>)	T ₃	Incrementa la tasa de supervivencia de las larvas.	Tachihara <i>et al.</i> , 1997
Pez roca (<i>Sebastes schlegeli</i>)	T ₃	Incrementa el desarrollo y supervivencia de las larvas.	Kang y Chang, 2004.
Pez zebra (<i>Danio rerio</i>)	T ₃	Intensifica la pigmentación del embrión y acelera la eclosión.	Walpita <i>et al.</i> , 2007.
Piracanjuba (<i>Brycon orbignyanus</i>)	T ₃	Incrementa el índice de supervivencia.	Landines <i>et al.</i> , 2010.

En el caso específico del catán, Mendoza *et al.* (2002) realizaron una serie de bioensayos en los que expusieron a las larvas a diferentes concentraciones de hormonas tiroideas (T₃ y T₄) por inmersión y a un agente anti-tiroideo (tiourea). El grupo de larvas tratado con la hormona T₄ presentó una rápida diferenciación y

desarrollo. Sin embargo, el grupo tratado con la hormona T_3 presentó la menor tasa de supervivencia además de algunas deformaciones. Los autores concluyeron que este efecto contraproducente de la hormona T_3 pudo ser ocasionado por una sobredosis, ya que en esta especie los niveles endógenos de esta hormona son más altos que en otras especies de peces (Mendoza y Aguilera, 2001; Mendoza *et al.*, 2002).

II.III.III. Aporte materno de hormonas tiroideas

La condición fisiológica de los reproductores ha sido identificada como un factor clave en la calidad de los huevos y la viabilidad larval (Power *et al.*, 2001). Generalmente se ha encontrado una correlación positiva entre el eje tiroideo y el estado reproductivo, de tal manera que un aumento en la concentración de hormonas tiroideas coincide con la maduración gonadal y la reproducción (Cyr y Eales, 1996). Además, diversos estudios indican que cuando estas hormonas se suministran a los reproductores antes de la ovulación, se almacenan en los ovocitos (Greenblatt *et al.*, 1989; Weber *et al.*, 1992; Lam, 1994; Tagawa *et al.*, 1994).

Han sido varios los estudios que demuestran un efecto benéfico de los niveles altos de T_3 materna en el desarrollo larval (Brown *et al.*, 1989; Ayson y Lam, 1993; Lam, 1994). Esto se debe a que la reserva materna de estas hormonas (Tabla II) satisface los requerimientos de las larvas para su crecimiento, desarrollo, osmorregulación, respuesta al estrés y otras funciones fisiológicas antes del desarrollo funcional de sus propias glándulas endocrinas (Lam, 1994).

Tabla II. Concentración de hormonas tiroideas provenientes de la madre en extractos de huevos fertilizados de diferentes especies de peces.

Especies	T ₄ (ng/g)	T ₃ (ng/g)	Referencia
<i>Oncorhynchus keta</i>	15-20	9	Tagawa y Hirano, 1987.
<i>Oncorhynchus nerka</i>	6*	1*	Leatherland <i>et al.</i> , 1989a.
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	4.2*	4*	Leatherland <i>et al.</i> , 1989a.
<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	1*	0.5*	Leatherland <i>et al.</i> , 1989a.
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	4.5*	1.5*	Leatherland <i>et al.</i> , 1989b.
<i>Oreochromis mossambicus</i>	2.1	11.4	Weber <i>et al.</i> , 1992.
<i>Siganus guttatus</i>	10-16	2	Ayson y Lam, 1993.
<i>Salmo trutta</i>	-	52	Mylonas <i>et al.</i> , 1994.
<i>Morone saxatilis</i>	-	10-16	Huang <i>et al.</i> 1996.

* Concentración de Hormonas Tiroideas reportada en ng/organismo.

Los estudios relacionados con la ontogenia del sistema endócrino de los peces, indican que las larvas son fisiológicamente inmaduras ya que cuentan con escasa o nula capacidad para producir ciertas enzimas, factores de crecimiento y hormonas hasta terminada la etapa de reabsorción del vitelo (Leatherland y Barrett, 1993; Tanaka *et al.*, 1995). Por consecuencia, durante la primera etapa del desarrollo, los peces dependen de fuentes exógenas (la madre o alimento vivo) para obtener estos factores de regulación (Lam, 1994). Un ejemplo de lo anterior es el caso de los salmones *Oncorhynchus keta*, *O. kisutch* y *O. tshawytscha*. En estas especies el nivel inicial de la hormona T₃ en los huevos que proviene de la madre disminuye gradualmente hasta completarse la absorción del vitelo, para después incrementarse una vez que las larvas cuentan con una glándula tiroidea funcional (Tagawa y Hirano, 1987 y 1990; Greenblatt *et al.*, 1989).

Kang y Chang (2004) inyectaron T₃ a hembras reproductoras de pez roca, *Sebastes schlegeli*, y encontraron un incremento significativo en la concentración de esta hormona en los huevos y las larvas. Además, el crecimiento y la tasa de

supervivencia de las larvas aumentaron significativamente con respecto al grupo control.

II.IV. Índices de condición e indicadores de desarrollo

La salud y condición de las larvas de peces puede ser estimada por medio de diferentes índices de condición, los cuales se dividen generalmente en cuatro categorías: morfométricos, histológicos, bioquímicos y moleculares (ver revisión por Ferron y Legget, 1994). Los morfométricos se basan en la detección de cambios en la forma externa del cuerpo. Estos cambios se expresan comúnmente como tasas o porcentajes de medidas corporales en relación a la longitud total o el peso de la larva. A nivel histológico, los cambios en la condición de la larva se detectan a través del análisis de la apariencia y arreglo de las células en los diferentes tejidos del pez, especialmente en el tejido digestivo. La condición bioquímica puede estimarse por medio de la cuantificación de los constituyentes químicos utilizados como sustratos energéticos. Finalmente, las medidas de condición moleculares se basan en las variaciones de los niveles de ácidos nucleicos y en su relación con la expresión diferencial de proteínas y el peso de los individuos.

En este estudio, además de índices de condición morfométricos, se utilizaron dos índices de condición moleculares y bioquímicos: la relación RNA:DNA y la actividad de las enzimas digestivas. La relación RNA:DNA se obtiene a partir de la cuantificación de ácidos nucleicos e indica la condición fisiológica de la larva, mientras que la actividad de las enzimas digestivas se correlaciona directamente con el grado de desarrollo del organismo, específicamente el de su sistema digestivo (Ferron y Legget, 1994).

II.IV.I. Ácidos nucleicos

La relación RNA:DNA ha probado ser un valioso indicador bioquímico de la condición fisiológica y nutricional de las larvas de peces durante su desarrollo (Clemmesen, 1987). El principio teórico de esta relación supone que el contenido

de DNA es virtualmente constante en los tejidos somáticos, de tal manera que las concentraciones tisulares de DNA reflejan solo el número de células y es independiente de la condición del organismo. Por otro lado, la cantidad de RNA celular, principalmente el RNA ribosomal (RNAr) disponible en los tejidos, es directamente proporcional al nivel de síntesis de proteínas (Buckley, 1984; Canino y Caldarone, 1995; Buckley *et al.*, 1999).

Un incremento en la relación RNA:DNA indica un aumento en la transcripción de RNA mensajero (RNAm) que después es traducido a proteínas metabólicas y estructurales en los ribosomas. Sin embargo, debido a que el RNAr representa más del 90% del RNA celular, los cambios en la relación RNA:DNA están más relacionados con cambios en la síntesis ribosomal. La relación RNA:DNA es un reflejo de la intensidad metabólica celular, y mientras mayor sea, mejor será la condición fisiológica de las larvas (Buckley, 1984; Canino y Caldarone, 1995; Buckley *et al.*, 1999).

En diversos estudios (Wright y Martin, 1985; Clemmesen, 1987; Raae *et al.*, 1988; Westerman y Holt, 1994; Deane *et al.*, 2003; Tardif *et al.*, 2005; Hook *et al.*, 2008), este índice molecular ha sido una excelente herramienta para evaluar la actividad y velocidad de desarrollo en las larvas de peces, además de que ha probado ser un indicador útil de la condición nutricional. Conjuntamente, se han propuesto diferentes índices igualmente basados en ácidos nucleicos, con el objetivo de buscar respuestas más precisas que reflejen la condición fisiológica de las larvas, como la concentración de RNA total, relación DNA/peso seco y relación RNA/peso seco (Buckley *et al.*, 1999).

En el caso específico del catán, Mendoza *et al.* (2008b) cuantificaron el total de ácidos nucleicos en las larvas con el método de Westerman y Holt (1994), y observaron que en larvas alimentadas con una dieta óptima, la relación RNA:DNA se incrementó. De igual forma, reportan que esta relación aumentó de forma gradual hasta los 13 DDE, y a partir de ese día se mantuvo estable, por lo que los autores sugieren que desde ese momento las larvas presentaron una tasa de crecimiento y tasa metabólica constantes.

II.IV.II. Actividad de las enzimas digestivas

En las larvas de peces, los órganos productores de las enzimas digestivas son el estómago, el páncreas y el intestino. La actividad proteolítica ácida se localiza principalmente en el estómago, y está asociada a la activación del pepsinógeno. El páncreas sintetiza y secreta una gran cantidad de enzimas alcalinas (glucosidasas, lipasas y proteasas) en el lumen intestinal. Las células del epitelio intestinal poseen dos tipos de enzimas: las enzimas intracelulares (citosólicas) y las extracelulares, localizadas en el borde en cepillo. Las enzimas del citosol son principalmente peptidasas, mientras que las enzimas del borde en cepillo están asociadas a la membrana celular y las hay de diferente tipo: peptidasas, fosfatasas, disacaridasas, y estererasas, entre otras (Lauff y Hofer, 1984; Govoni *et al.*, 1986; Zambonino-Infante y Cahu, 2001).

La ontogenia de la actividad enzimática en las larvas de peces se correlaciona con eventos que marcan el desarrollo del sistema digestivo. La actividad enzimática es relativamente baja cuando el embrión eclosiona, y se incrementa gradualmente durante el periodo larvario hasta que se desarrolla totalmente el sistema digestivo e inicia la secreción de ácido clorhídrico y pepsinógeno (Lauff y Hofer, 1984; Govoni *et al.*, 1986; Zambonino-Infante y Cahu, 2001).

El estudio de la ontogenia de la actividad enzimática es una de las principales aproximaciones para evaluar la capacidad digestiva de las larvas de peces. Esto hace posible conocer el grado de desarrollo, ya que se detecta el momento en que las larvas expresan cada tipo de enzima y por consiguiente el momento en que tienen la capacidad de digerir eficientemente los nutrientes (Lauff y Hofer, 1984; Govoni *et al.*, 1986; Zambonino-Infante y Cahu, 2001).

La actividad de las proteasas alcalinas (ej. actividad proteolítica alcalina total y actividad de la tripsina) se detecta desde el inicio del desarrollo y antes de la apertura de la boca. En contraste, la actividad de las proteasas ácidas (ej., actividad proteolítica ácida total), se observa hacia el final de la etapa larval y es considerada como el indicador de un estómago funcional. Otras enzimas que

suelen estudiarse son la leucinoaminopeptidasa y la fosfatasa alcalina. Estas últimas son enzimas del epitelio intestinal y se consideran indicadores del grado de madurez del intestino y del estado nutricional de las larvas (Lauff y Hofer, 1984; Govoni *et al.*, 1986; Zambonino-Infante y Cahu, 2001).

En el caso de las larvas de catán, Mendoza *et al.* (2008b) detectaron actividad proteolítica ácida desde el inicio de la alimentación exógena, a los 5 DDE, lo cual es previo a la absorción completa del vitelo. En comparación, la actividad proteolítica alcalina se elevó gradualmente de los 2 a los 9 DDE. Por otra parte, la actividad de las fosfatasas alcalinas se incrementó a partir de los 8 DDE concomitante con el aumento en la altura de las células del epitelio intestinal, por lo cual esta actividad resulta indicativa de la maduración del intestino.

III. Justificación

Los lepisosteidos (*Atractosteus spatula* y *Lepisosteus oculatus*) son especies ancestrales y endémicas de gran valor científico y comercial cuyas poblaciones están amenazadas por la sobreexplotación y por la alteración de su hábitat natural. En consecuencia, es de vital importancia la elaboración de medidas eficaces para su conservación y aprovechamiento.

La evaluación del efecto de las hormonas tiroideas en el desarrollo temprano de las larvas de ambas especies permitirá desarrollar protocolos de cultivo larvario más exitosos. Se ha observado que al administrar estas hormonas a las hembras, embriones o larvas, se incrementa el desarrollo y la supervivencia de las larvas. Además, tienen un crecimiento mayor y más homogéneo, lo que reducirá el canibalismo que se observa en el cultivo. Asimismo, el evaluar dos métodos distintos de aplicación de estas hormonas permitirá definir el método más efectivo y costeable.

Aunado a lo anterior, el conocimiento del aporte materno y el entendimiento del papel de estas hormonas en la reproducción sentarán las bases para realizar un manejo más eficiente de los reproductores con el fin de contar con un mayor número de desoves exitosos e incrementar la tasa de eclosión de las larvas.

Finalmente, este estudio permitirá obtener conocimientos básicos sobre el efecto de las hormonas tiroideas en la fisiología del desarrollo temprano de especies de peces primitivos, temática escasamente estudiada hasta el momento. Además, se desconocen muchos aspectos sobre la reproducción y el desarrollo larval del pejelagarto pinto (*Lepisosteus oculatus*), por lo que el conocimiento generado en este trabajo podrá ser comparado con el de otras especies de lepisosteidos cultivadas actualmente para considerar al pejelagarto pinto como una especie con potencial acuícola.

IV. Objetivos

Objetivo general

- Evaluar el efecto de las hormonas tiroideas (T_3 , T_4 y TSH) sobre la supervivencia, desarrollo y crecimiento de larvas de catán (*Atractosteus spatula*) y pejelagarto pinto (*Lepisosteus oculatus*).

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de las hormonas tiroideas (T_3 , T_4 y TSH) en la reproducción, a partir del número de desoves exitosos, número de huevos desovados y la tasa de eclosión de las larvas.
- Cuantificar la concentración de hormonas tiroideas (T_3 y T_4) en los huevos y larvas durante su desarrollo.
- Comparar la eficacia de dos métodos distintos de administración de hormonas tiroideas (exposición directa de los huevos y transferencia materna).
- Evaluar el efecto de las hormonas tiroideas (T_3 , T_4 y TSH) sobre la condición de las larvas utilizando índices morfométricos (tasa de crecimiento, tamaño del saco vitelino y desarrollo del hocico).
- Evaluar el efecto de las hormonas tiroideas (T_3 , T_4 y TSH) utilizando índices de condición moleculares (relación RNA:DNA, relación DNA:peso seco y relación RNA:peso seco).
- Cuantificar la actividad de las proteasas digestivas (actividad proteolítica alcalina total, actividad proteolítica ácida total, actividad tipo tripsina y actividad tipo leucina-aminopeptidasa) como índices bioquímicos para estimar el grado de desarrollo de las larvas.

V. Hipótesis

Al aplicar hormonas tiroideas a las hembras adultas de pejelagarto pinto (*Lepisosteus oculatus*) y a los huevos de catán (*Atractosteus spatula*), estas se incorporarán a los huevos y serán utilizadas durante el desarrollo embrionario, lo que incrementará la supervivencia y acelerará el desarrollo de las larvas. Específicamente, provocará un incremento en la relación RNA:DNA y se acelerará e incrementará la actividad de las proteasas digestivas.

VI. Materiales y métodos

VI.I. Inducción al desove y aplicación de hormonas tiroideas.

VI.I.I. Pejelagarto pinto (*Lepisosteus oculatus*)

Los reproductores de pejelagarto pinto utilizados en este estudio fueron recolectados con redes agalleras en el pantano Bayou Chevreuil en St. James Parish, Luisiana, EUA. En total se utilizaron 36 hembras con un peso promedio de 0.92 ± 0.32 kg y una longitud total promedio de 60.42 ± 6.39 cm y 108 machos con un peso promedio de 0.60 ± 0.12 kg y una longitud total promedio de 51.75 ± 5.12 cm. Los organismos fueron trasladados a las instalaciones de la Nicholls State University, en Thibodaux, Luisiana, donde se mantuvieron hasta iniciar los bioensayos.

Para inducir el desove se utilizaron 3 hembras y 9 machos a la vez. Los peces se colocaron en tanques de plástico de 400 litros en los cuales se adicionó un sustrato artificial para simular la vegetación. A todos los organismos se les inyectó una solución de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) (Ovaprim® - Syndel Laboratories) a una dosis de 0.5 ml/kg para inducir la reproducción. Posteriormente, se procedió a inyectar las hormonas tiroideas utilizando como vehículo DMSO (Dimethyl Sulfoxide, SIGMA No. Cat. 275865). Las dosis utilizadas fueron: 20 mg/kg de T₃ (3,3',5-Triiodo-L-thyronine, SIGMA No. Cat. 564605) y T₄ (L-Thyroxine, SIGMA No. Cat. T1775), 4 IU/kg de TSH (Thyrotropic hormone from bovine pituitary, SIGMA No. Cat. T8931) y 0.5 ml/kg de DMSO como tratamiento control.

En la Figura 2 se muestra un esquema del diseño experimental. Se utilizaron tres desoves por tratamiento (n=3) exceptuando el control en el que solo se consideraron dos, debido a que el número de desoves exitosos fue limitado (huevos insuficientes y/o bajo porcentaje de fertilización). Los huevos de cada desove fueron incubados por separado para mantener las repeticiones independientes entre sí.

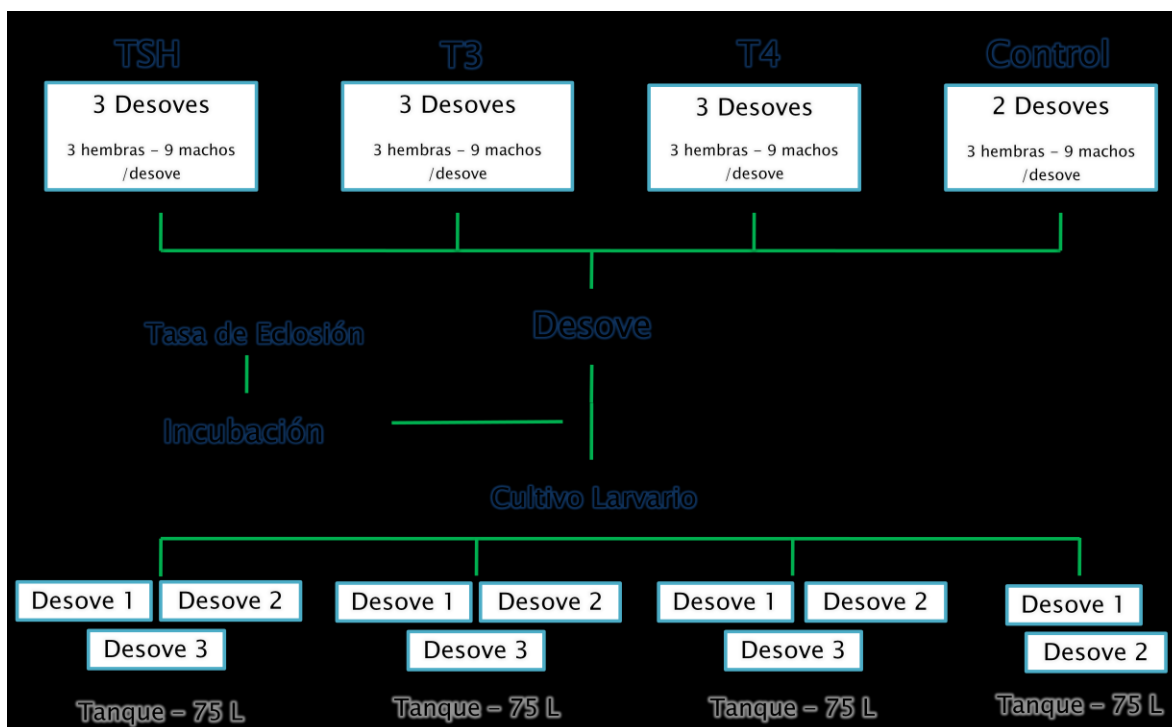


Figura 2. Diseño experimental utilizado para evaluar el efecto de las hormonas tiroideas sobre el desarrollo temprano del pejelagarto pinto.

VI.I.II. Catán (*Atractosteus spatula*)

En el caso del catán, se utilizó el lote de reproductores del Laboratorio de Ecofisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. En total se utilizaron 3 hembras con un peso promedio de 9.6 kg y una longitud total promedio de 1.45 m; y 9 machos con un peso promedio de 4.7 kg y una longitud promedio de 1.10 m.

La inducción al desove se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Mendoza *et al.* (2002). Las hembras fueron inyectadas con la solución comercial Ovaprim® (Syndel Laboratories) a una dosis de 0.5 ml/kg para inducir la reproducción. Posteriormente, fueron trasladadas junto a los machos a un estanque rústico de 7 x 7 m, en el que se colocaron previamente ramas de *Casuarina sp.*, las cuales sirvieron como sustrato para que las hembras depositaran los huevos.

En este bioensayo se realizó un solo desove. Los huevos fértiles fueron recolectados y organizados en 6 grupos independientes de 200 huevos. Tres de esos grupos fueron utilizados como tratamiento control (n=3), y a los otros tres se les administró un baño de dos horas con la hormona T₃ a una concentración de 1 ppm (Landines *et al.*, 2010). En la Figura 3 se muestra un esquema del diseño experimental.

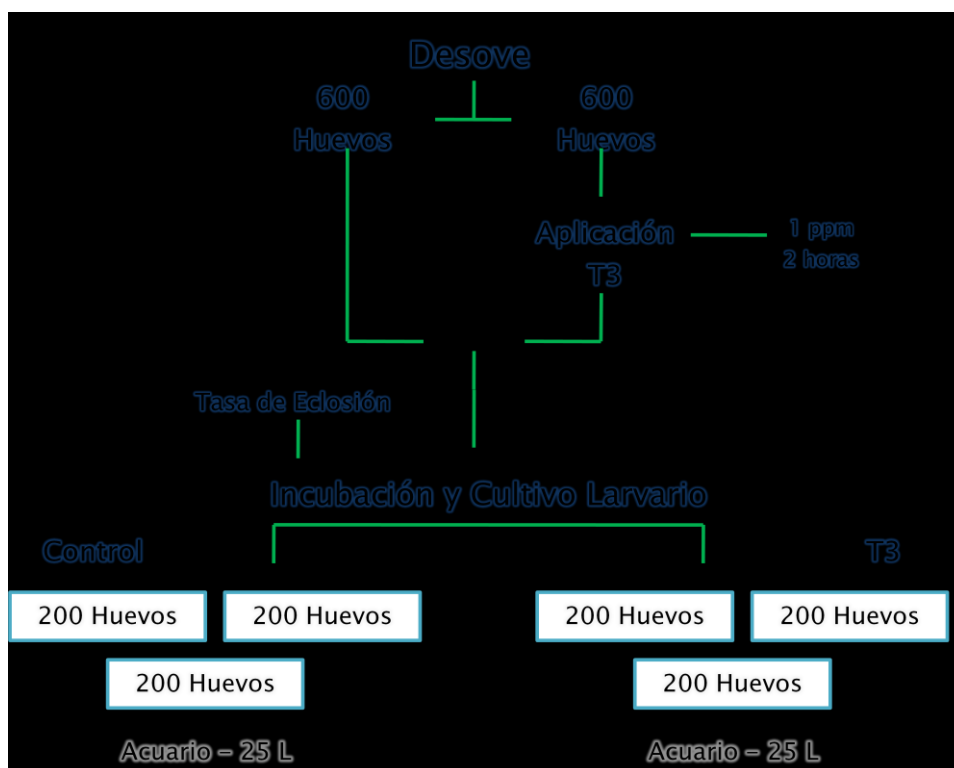


Figura 3. Diseño experimental utilizado para evaluar el efecto de las hormonas tiroideas sobre el desarrollo temprano del catán.

VI.II. Cultivo larvario y método de muestreo

VI.II.I. Pejelagarto pinto (*Lepisosteus oculatus*)

Los huevos de cada desove fueron incubados de manera independiente en tanques de fibra de vidrio de 75 L conectados a un sistema de recirculación (temperatura $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$; oxígeno disuelto 5 mg/L). Se tomó una muestra de 20 huevos por tanque para medir su diámetro y para cuantificar la concentración de hormonas tiroideas.

Para evaluar la tasa de eclosión, se utilizaron cubetas de 5 litros, en cada cubeta se incubaron 100 huevos (tres repeticiones por desove, n=9). El agua de las cubetas se mantuvo a temperatura constante (22°C), y una vez que eclosionaron las larvas, se contaron para calcular la tasa de eclosión. Posteriormente, se colocaron 100 larvas recién eclosionadas en otra cubeta de 5 litros, y se mantuvieron bajo inanición durante 15 días. Después de los 15 días, se contaron las larvas que seguían con vida para calcular la tasa de supervivencia.

El cultivo larvario se realizó en el mismo sistema de recirculación donde se incubaron los huevos (tanques de 75 L; temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$; oxígeno disuelto 5 mg/L). Las larvas fueron alimentadas a saciedad aparente cuatro veces por día con una dieta iniciadora Silver Cup® (52% proteína, 16% lípidos) a partir de los 5 DDE (una vez que absorbieron todo el vitelo).

El cultivo tuvo una duración de 15 días. Se recolectaron 30 larvas por tanque cada tercer día (0, 3, 6, 9, 12 y 15 DDE). El muestreo se realizó durante la mañana, antes de la primera alimentación, y las larvas se sacrificaron con una sobredosis de anestésico (aceite de clavo, SIGMA No. Cat. C8392). Se fotografiaron para el análisis morfométrico y se congelaron a -80°C para la cuantificación de las hormonas tiroideas, análisis de ácidos nucleicos y actividad de las enzimas digestivas. Adicionalmente, para conocer el peso seco de las larvas al momento de la eclosión, se recolectaron 30 larvas recién eclosionadas de cada tanque, se secaron en una estufa (Fisher Isotemp 500 Series) a 40°C y posteriormente se pesaron en una balanza analítica (Adventurer OHAUS AR0640, precisión de 0.001g).

Los índices de condición morfométricos utilizados fueron tasa de crecimiento (mm/día), tamaño del saco vitelino en relación con la longitud total (%) e índice de desarrollo del hocico en relación con la longitud total (%). Las mediciones se hicieron utilizando el software ImageJ 1.44 (Image Processing and Analysis in Java, National Institutes of Health, EUA), a partir de las fotografías tomadas durante cada muestreo.

VI.II.II. Catán (*Atractosteus spatula*)

En el bioensayo con el catán, los seis grupos de 200 huevos (3 repeticiones control y 3 repeticiones T₃, n=3) fueron incubados de manera independiente en acuarios de 25 L (temperatura 29 ± 1°C; oxígeno disuelto 5 mg/L). Se tomó una muestra de 5 huevos por acuario para medir su diámetro y para cuantificar la concentración de hormonas tiroideas. La tasa de eclosión se calculó a partir del número de huevos en los que el embrión no eclosionó.

Una vez que eclosionaron los embriones, se procedió a cultivar las larvas en el mismo grupo de acuarios donde se incubaron los huevos (acuarios de 25 L; temperatura 29 ± 1°C; oxígeno disuelto 5 mg/L). Las larvas fueron alimentadas a saciedad aparente cuatro veces por día con una dieta iniciadora Silver Cup® (52% proteína, 16% lípidos) a partir de los 3 DDE (una vez que absorbieron todo el vitelo).

El cultivo tuvo una duración de 10 días. Se recolectaron 20 larvas por acuario cada dos días (0, 2, 4, 6, 8 y 10 DDE). El método de muestreo fue igual al descrito para el pejelagarto pinto, al igual que los índices de condición morfométricos utilizados.

VI.III. Cuantificación de hormonas tiroideas

Para cuantificar la concentración de las hormonas tiroideas en huevos y larvas de pejelagarto pinto se liofilizaron (LABCONCO Freeze Dryer 4.5) y posteriormente, se hizo la extracción a partir de una modificación de la técnica descrita por Kobuke *et al.* (1987) (Figura 4). Las muestras (un pool de 5 huevos o 3 larvas por acuario/tanque, n=3) fueron homogenizadas con un homogenizador de tejidos Potter-Wheaton (Fisher Scientific No. Cat. 08-414-16A) en 1 ml de etanol puro conteniendo 6-N-Propyl-2-Thiouracil 1 mM (SIGMA No. Cat. P3755); este compuesto se adicionó para bloquear la conversión enzimática de T₄ a T₃. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 1,700g durante 10 min a 4°C (Eppendorf Centrifuge 5804 R). El sobrenadante fue secado en una estufa (Labnet

211D) a 37°C durante toda la noche, y el precipitado fue reconstituido en 50 μ L de etanol y 450 μ L de buffer barbital 0.11 M pH 8.6 (SIGMA No. Cat. B6632).

Las muestras reconstituidas fueron enviadas al Laboratorio del Servicio de Endocrinología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en donde se cuantificó la concentración de las hormonas T₃ y T₄ (ng/larva o huevo) mediante un radioinmunoensayo (RIA) basado en la técnica descrita por Evered *et al.* (1976).

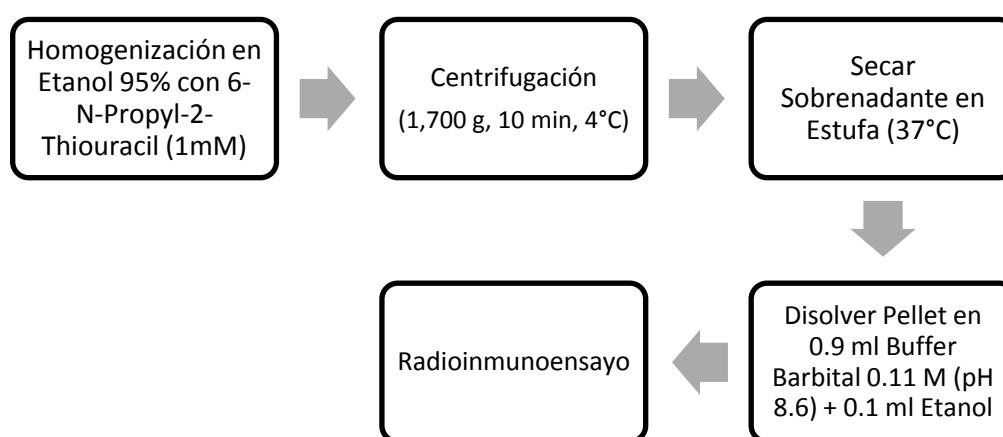


Figura 4. Metodología utilizada para la extracción de hormonas tiroideas (Kobuke *et al.*, 1987).

VI.IV. Actividad de las enzimas digestivas

Para cuantificar la actividad de las enzimas digestivas en las larvas, las muestras de pejelagarto pinto y de catán fueron liofilizadas (LABCONCO Freeze Dryer 4.5) y trasladadas al laboratorio de Nutrición del Departamento de Acuicultura del CICESE.

VI.IV.I. Obtención del extracto enzimático

Con el propósito de eliminar los inhibidores enzimáticos que pudieran estar presentes en la musculatura, así como otras enzimas relacionadas con el

metabolismo de las proteínas musculares, se disecó el sistema digestivo de las larvas (un pool de 10 larvas por tanque/acuario).

El extracto enzimático se obtuvo al homogenizar las muestras con un homogenizador de tejidos Potter-Wheaton en 1 ml de agua destilada en un baño de hielo. Se tomó una alícuota de 200 μL y el resto del homogenizado se centrifugó a 16,000 g durante 30 min a 4°C (Eppendorf Centrifuge 5417 R). El sobrenadante se repartió en alícuotas de 200 μL que fueron almacenadas a -20°C hasta ser analizadas.

VI.IV.II. Cuantificación de proteína soluble

La cantidad de proteína soluble en las muestras se cuantificó de acuerdo al método de Bradford (1976), utilizando un kit de Bio-Rad (Quick Start Bradford Protein Assay, No. Cat. 500-0206). En este caso, se utilizó el protocolo para microplacas de 96 pozos. Primeramente, se mezclaron 5 μL de muestra con 250 μL del reactivo de Bio-Rad (azul de Coomassie). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, para después leer la absorbancia de cada pozo de la placa en un lector de microplacas a 595 nm (Beckman Coulter, AD 200). La concentración de proteína ($\mu\text{g/ml}$) se obtuvo al comparar la absorbancia de las muestras con la de una curva estándar preparada con albumina de suero bovino (0-1000 $\mu\text{g/ml}$).

VI.IV.III. Actividad proteolítica alcalina total

Para la medición de la actividad proteolítica alcalina se utilizó una modificación de la metodología de Sarath *et al.* (1989). A 15 μL de extracto enzimático se le añadieron 200 μL de azocaseína al 2% (SIGMA No. Cat. A-2765). La mezcla se incubó a 37°C durante 30 min. Al término de este tiempo, se detuvo la reacción con 400 μL de ácido tricloroacético al 5% y se dejó reposar durante 15 min a 4°C. La proteína precipitada se eliminó por centrifugación a 19,000 g durante 5 min. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 366 nm contra un blanco en el que el extracto enzimático se inactivó por adición del ácido antes de

iniciar la reacción. Se utilizó tripsina comercial (SIGMA No. Cat. T-0303) en una concentración de reacción de 10 µg/ml como control.

VI.IV.IV. Actividad proteolítica ácida total

Para la medición de la actividad proteolítica ácida se utilizó una modificación de la metodología de Sarath *et al.* (1989). A 15 µL de extracto enzimático se le añadieron 200 µL de hemoglobina al 2% (SIGMA No. Cat. H-2625). La mezcla se incubó a 37°C durante 10 min; al término de este tiempo se detuvo la reacción con 400 µL de ácido tricloroacético al 5% y se dejó reposar durante 15 min a 4°C. La proteína precipitada se eliminó por centrifugación a 19,000 g durante 5 min. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm contra un blanco en el que el extracto enzimático se inactivó por adición del ácido antes de iniciar la reacción. Se utilizó pepsina comercial (SIGMA No. Cat. P-7012) en una concentración de reacción de 10 µg/ml como control.

VI.IV.V. Actividad tipo tripsina

Para la medición de la actividad tipo tripsina se utilizó una modificación de la metodología de Erlanger *et al.* (1961). En una microplaca de 96 pozos, se añadieron 10 µL de extracto enzimático y 100 µL de BAPNA (N α -Benzoil-DL-Arginina-P-Nitroanilida, SIGMA No. Cat. B4875). Se tomó una lectura inicial de la absorbancia a 410 nm, se incubó la placa a 30°C durante 10 min, y al término de este tiempo se tomó una lectura final de la absorbancia a 410 nm a la cual se le restó el valor de la lectura inicial (blanco). Se utilizó tripsina comercial (SIGMA No. Cat. T-0303) en una concentración de reacción de 10 µg/ml como control.

VI.IV.VI. Actividad tipo leucina-aminopeptidasa

Para la medición de la actividad tipo leucina-aminopeptidasa se utilizó una modificación de la metodología de Appel (1974). Esta enzima se encuentra asociada al epitelio intestinal, por lo que no se centrifugó el extracto, ya que al centrifugar y eliminar los tejidos no disueltos en agua puede perderse cierta

cantidad de la enzima. En una microplaca de 96 pozos, se añadieron 10 μL de extracto enzimático y 90 μL de l-leucina-p-nitroanilida (SIGMA No. Cat. L-9125). Se tomó una lectura inicial de la absorbancia a 410 nm, se incubó la placa a 37°C durante 30 min, y al término de este tiempo se tomó una lectura final de la absorbancia a 410 nm, a la cual se le restó el valor de la lectura inicial (blanco). Se utilizó aminopeptidasa comercial (SIGMA No. Cat. L5006) en una concentración de reacción de 10 $\mu\text{g/ml}$ como control.

VI.IV.VII. Cuantificación de la actividad

La actividad de las enzimas digestivas se expresó en unidades de actividad (U), donde 1U se definió como el incremento de 0.01 unidades de absorbancia/min. Los valores reportados representan la media de tres mediciones realizadas en muestras independientes (n=9). La leucina-aminopeptidasa presenta alta afinidad por el sustrato, por lo que en este caso se definió 1U como el cambio de 0.1 unidades de absorbancia/min. La actividad se expresó como actividad total (U/larva) y como actividad específica (U/mg P).

- Actividad total:

$$U/\text{larva} = \left[\frac{\Delta\text{Abs.}/\text{min} * \text{FD} * 1000}{E * \text{VM}} \right] / \frac{\# \text{ larvas}}{\text{ml}}$$

Donde el cambio en la absorbancia por minuto es la diferencia entre la absorbancia de la muestra y la del blanco, dividida entre el tiempo de incubación; FD es el factor de dilución (volumen total de la reacción/volumen de extracto); 1,000 es el volumen de agua en que se homogenizaron los tractos digestivos de las larvas; E es 0.01 (proteasas totales y tripsina) ó 0.1 (leucina-aminopeptidasa) y VM es el volumen de extracto utilizado.

- Actividad específica:

$$U \text{ actividad}/\text{mg Proteína} = \frac{U \text{ actividad}}{\text{larva}} / \frac{\text{mg Proteína}}{\text{larva}}$$

VI.V. Análisis de ácidos nucleicos

Para cuantificar la concentración de los ácidos nucleicos en las larvas del pejelagarto pinto y catán, las muestras fueron liofilizadas (LABCONCO Freeze Dryer 4.5). Con la intención de utilizar únicamente el tejido muscular, se disecó el pedúnculo caudal de las larvas de ambas especies (un pool de 5 larvas por tanque/acuario) y se midió el peso seco del tejido de cada muestra (mg), para posteriormente calcular la relación DNA:peso seco y RNA:peso seco.

Para la cuantificación de los ácidos nucleicos se utilizó la técnica descrita por Kaplan *et al.* (2001) (Figura 5). Las muestras fueron homogenizadas con un homogenizador de tejidos Potter-Wheaton (Fisher Scientific No. Cat. 08-414-16A) en 0.5 ml de una solución con NaCl 0.1 M y SDS al 0.2%, y posteriormente se digirieron durante 2 horas a 55°C con 10 µg/ml de Proteinasa K (BIOLINE No. Cat. 37084). A continuación, las muestras se centrifugaron a 13,000 g por 10 min, una alícuota de 10 µL del sobrenadante se colocó en una microplaca de 96 pozos con 50 µL de una solución con PicoGreen (Invitrogen No. Cat. P7589). El PicoGreen es un fluoróforo que se une específicamente al DNA de doble cadena (dsDNA).

La fluorescencia de las muestras se cuantificó en un fluorómetro (BioTek Synergy) a 500nm de excitación y 535nm de emisión. La concentración de dsDNA (ng) se calculó con una curva estándar (0-500 ng, Lambda DNA Standard, Invitrogen PicoGreen dsDNA Assay Kit No. Cat. P7589).

Para evaluar la concentración de RNA total (ng) en las muestras, se colocaron 10 µL del sobrenadante en otra microplaca de 96 pozos con 50 µL de una solución con la enzima DNasa I libre de RNasa (2 unidades/pozo, FERMENTAS No. Cat. EN0521) disuelta en Tris 50 mM pH 7.5 y MgCl₂ 10 mM. Esta placa se incubó durante 30 min a 37°C y, posteriormente se añadieron 50 µL de una solución con RiboGreen (Invitrogen No. Cat. R11490). El RiboGreen es un fluoróforo que se une a los ácidos nucleicos en general, por lo que al degradar el DNA de las muestras con la enzima DNasa, la fluorescencia resultante corresponde al RNA.

Al igual que con el dsDNA, la concentración de RNA se cuantificó por medio de fluorimetría (Fluorometro BioTek Synergy, 500nm de excitación y 535nm de emisión) comparando la fluorescencia emitida por las muestras con una curva estándar (0-500 ng, RNA Ribosomal 16s de *E. coli*, Invitrogen RiboGreen RNA Assay Kit No. Cat. R11490).

Todos los análisis se realizaron por triplicado (n=9), y al finalizar se calculó la razón RNA:DNA (ng de RNA/ng de DNA), la razón RNA:peso seco (ng de RNA/mg de tejido utilizado) y la razón DNA:peso seco (ng de DNA/mg de tejido utilizado).

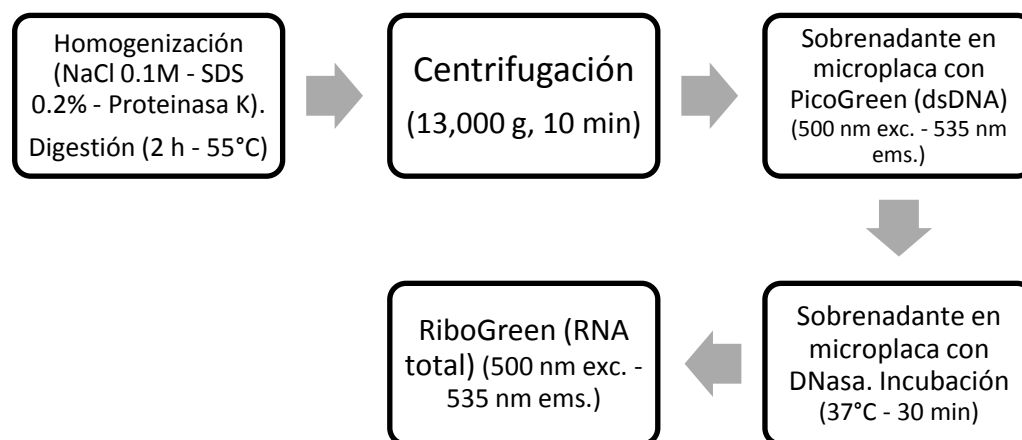


Figura 5. Metodología utilizada para la cuantificación de ácidos nucleicos (Kaplan *et al.*, 2001).

VI.VI. Análisis estadístico

Se realizó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de homogeneidad de varianza de Levene para asegurar que los datos cumplieran con los supuestos de la estadística paramétrica. En caso de no ser así, los datos se transformaron por logaritmo natural y se comprobó la normalidad y homogeneidad de varianza. Los datos de porcentaje se transformaron con la función arcoseno (Zar, 1984).

Se utilizó un ANOVA de dos vías para evaluar la presencia de diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre tratamientos y entre días de muestreo. Cuando se encontraron diferencias, se aplicó la prueba de comparación múltiple de Fisher LSD. En el caso de las variables en las cuales no se hicieron muestreos en distintos días, se utilizó un ANOVA de una vía para evaluar las diferencias entre los tratamientos (Zar, 1984). Todos los análisis fueron realizados con el software STATISTICA 8.0.

VII. Resultados

VII.I. Cuantificación de hormonas tiroideas

VII.I.I. Catán

Los huevos que fueron expuestos a la T_3 tuvieron una concentración significativamente mayor (Anova de 2 vías, $F(6,28)=15.78$, $p<0.001$, $n=3$) de esta hormona (113.83 ± 39.57 ng/huevo) que los huevos del tratamiento control (17.17 ± 14.73 ng/huevo) (Figura 6). Sin embargo, al momento de la eclosión, la concentración disminuyó drásticamente, y no se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamientos. Por otra parte, a partir de la eclosión, la concentración de T_3 se mantuvo en niveles basales durante el desarrollo (1.04 ± 1.02 ng/larva).

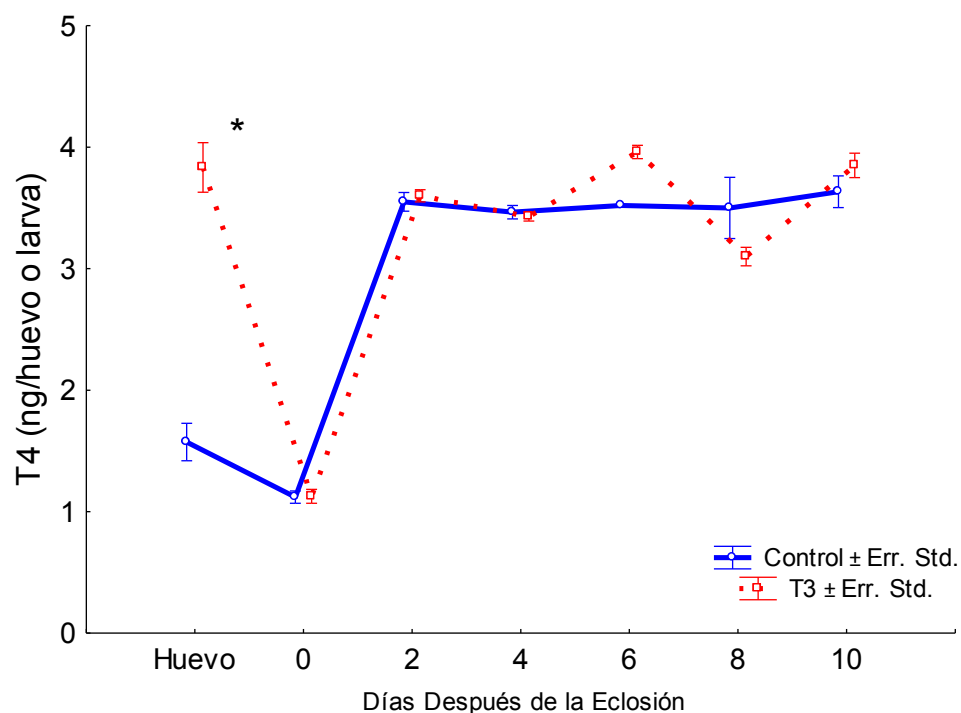


Figura 6. Concentración (ng/huevo o larva) de la hormona T_3 en huevos y larvas de catán provenientes del tratamiento control y del tratamiento en que los huevos fueron expuestos a la hormona T_3 . El (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, $p<0.05$).

Se cuantificó una concentración significativamente mayor (Anova de 2 vías, $F(6,28)=29.29$, $p<0.001$, $n=3$) de la hormona T_4 en los huevos que fueron expuestos a la T_3 (3.83 ± 0.35 ng/huevo), en comparación con la concentración registrada en los huevos del tratamiento control (1.57 ± 0.26 ng/huevo) (Figura 7). Sin embargo, al administrar T_3 a los huevos, el incremento de la T_4 no fue tan elevado como el que registró la hormona T_3 (113.83 ± 39.57 ng/huevo).

Al igual que en el caso de la T_3 , al momento de la eclosión, la concentración de la T_4 disminuyó en ambos tratamientos (1.12 ± 0.09 ng/larva T_3 ; 1.12 ± 0.08 ng/larva control). Sin embargo, a diferencia de la T_3 , la concentración de la T_4 se incrementó a los 2 DDE (3.6 ± 0.08 ng/larva T_3 ; 3.55 ± 0.13 ng/larva control), y a partir de ese momento se mantuvo relativamente consistente durante el desarrollo de las larvas en ambos tratamientos.

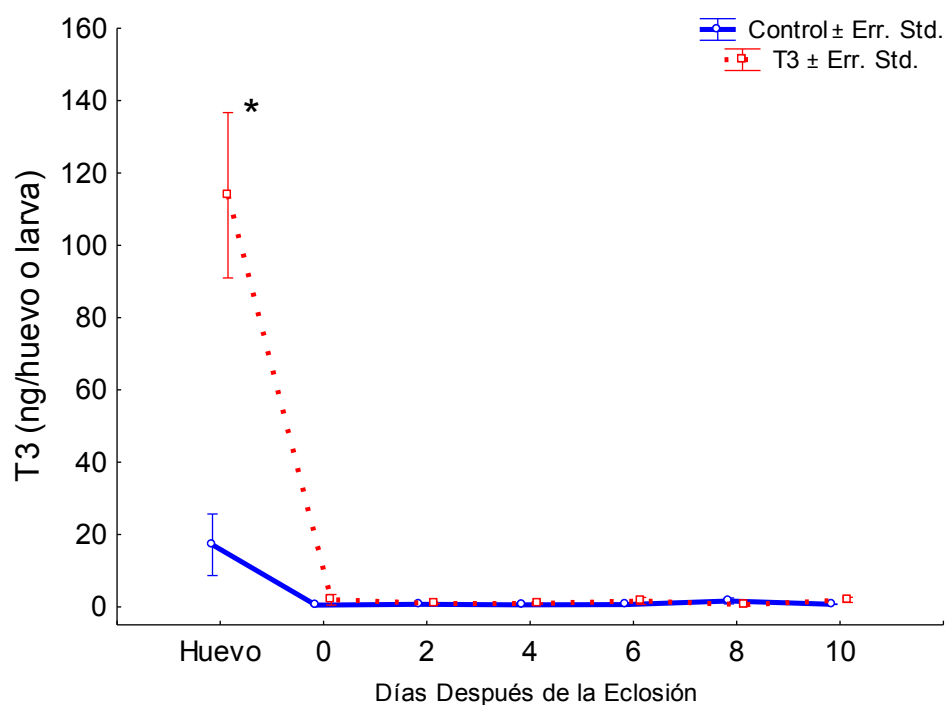


Figura 7. Concentración (ng/huevo o larva) de la hormona T_4 en huevos y larvas de catán provenientes del tratamiento control y del tratamiento en que los huevos fueron expuestos a la hormona T_3 . El (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, $p<0.05$).

VII.I.II. Pejelagarto pinto

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de T_3 en los huevos y larvas de pejelagarto pinto de los distintos tratamientos. Sin embargo, los huevos provenientes de hembras inyectadas con T_3 contenían una mayor concentración de esta hormona (4.18 ± 2.66 ng/huevo) aunque, al momento de la eclosión, la concentración disminuyó al mismo nivel del tratamiento control (1.01 ± 0.45 ng/larva) (Figura 8).

Por otra parte, las larvas provenientes de hembras inyectadas con la T_4 contenían una mayor concentración de la hormona T_3 al momento de la eclosión (4.96 ± 2.67 ng/larva). No obstante, a los 3 DDE el nivel de esta hormona disminuyó y no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos (2.19 ± 2.002 ng/larva). A partir del tercer DDE, el nivel de T_3 de las larvas de todos los tratamientos se incrementó ligeramente conforme avanzó el desarrollo. Sin embargo, no se alcanzan a apreciar tendencias claras debido a la amplia variación en los datos.

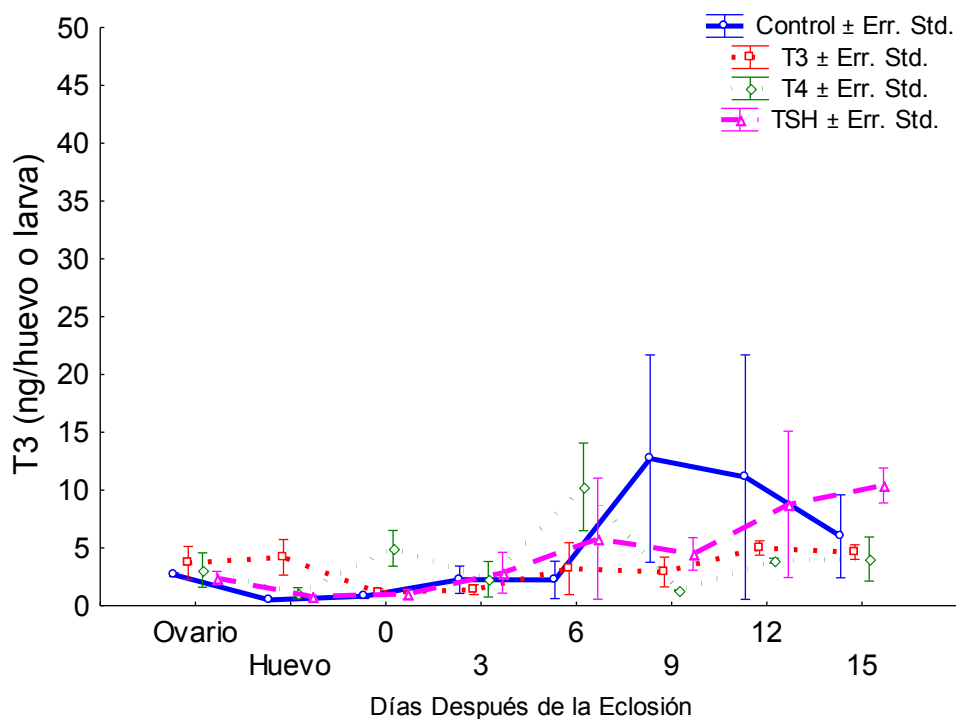


Figura 8. Concentración (ng/huevo o larva) de la hormona T_3 en huevos y larvas de pejelagarto pinto provenientes del tratamiento control y de los tratamientos con hormonas tiroideas.

Los huevos provenientes de hembras inyectadas con T₃ y T₄ contenían una concentración significativamente mayor (Anova de 2 vías, F(21,56)=4.58, p<0.001, n=3) de T₄ (5.06 ± 0.59 y 5.97 ± 3.07 ng/huevo, respectivamente) con respecto a la de los tratamientos con TSH y el control (1.08 ± 0.28 y 0.905 ± 0.33 ng/huevo, respectivamente) (Figura 9). Por otra parte, la concentración de T₄ de los ovocitos inmaduros (ovario) de las hembras tratadas con T₃ y T₄ fue significativamente menor (0.72 ± 0.14 y 1.75 ± 0.09 ng/huevo, respectivamente) que la de los huevos fertilizados (5.06 ± 0.59 y 5.97 ± 3.07 ng/huevo, respectivamente).

Al igual que en las larvas de catán, al momento de la eclosión la concentración de la hormona T₄ disminuyó al mismo nivel del tratamiento control (0.89 ± 0.30 ng/larva). A partir del tercer DDE, se presentó un incremento gradual de la concentración de esta hormona durante el desarrollo de las larvas, y a los 15 DDE alcanzó una concentración promedio de 4.32 ± 0.84 ng/larva, similar a la de los otros tratamientos.

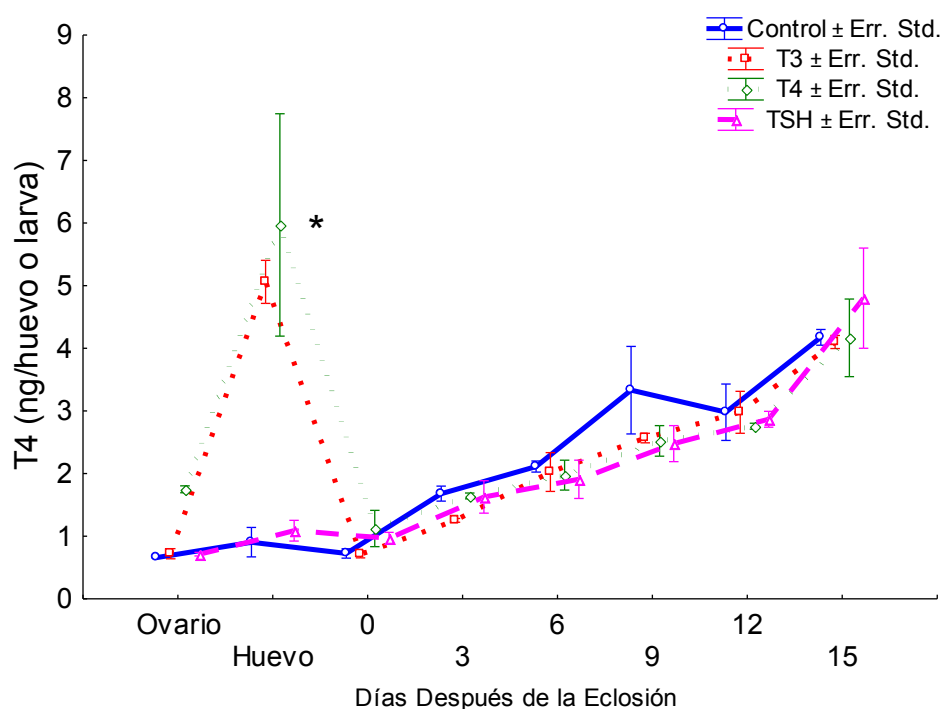


Figura 9. Concentración (ng/huevo o larva) de la hormona T₄ en huevos y larvas de catán del tratamiento control y de los tratamientos con hormonas tiroideas. El (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, p<0.05).

VII.II. Reproducción, condición morfológica y supervivencia

VII.II.I. Catán

La tasa de eclosión de los huevos expuestos a la T_3 fue de $94.18 \pm 2.31\%$ y no se encontraron diferencias significativas en relación a la tasa de eclosión del grupo control, la cual fue de $94.33 \pm 0.99\%$. Por otra parte, la inmersión de los huevos en la T_3 provocó un incremento significativo (Anova, $F(1,28)=7.75$, $p<0.01$, $n=15$) en su diámetro (4.42 ± 0.36 mm vs. 4.09 ± 0.27 mm).

Al momento de la eclosión, el tamaño del saco vitelino de las larvas del tratamiento control fue significativamente mayor (Anova, $F(1,23)=8.26$, $p<0.01$, $n=11$) al de las larvas que fueron expuestas a la T_3 ($102.45 \pm 14.42\%$ y $93.27 \pm 12.16\%$, respectivamente) (Figura 10). A los 2 DDE, no se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamientos ($30.60 \pm 4.06\%$ tratamiento control; $29.02 \pm 4.21\%$ tratamiento T_3).

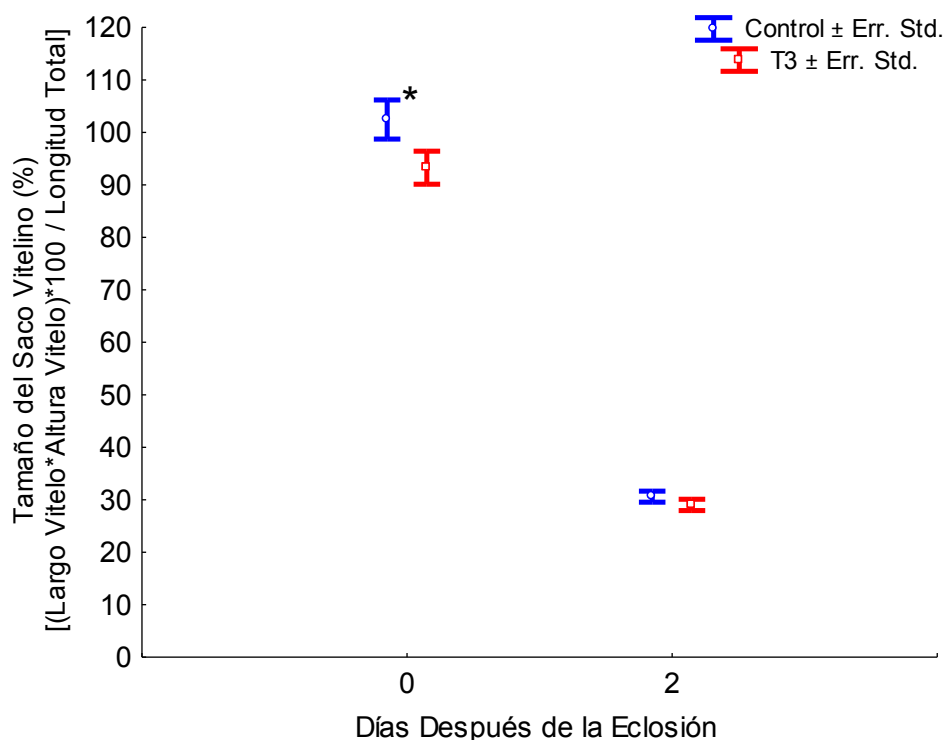


Figura 10. Tamaño relativo del saco vitelino (%) en relación a la longitud total de larvas de catán expuestas a la hormona T_3 en comparación con el tratamiento control. El (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (Anova, $p<0.05$).

No se encontraron diferencias significativas en la longitud total y la tasa de crecimiento de las larvas de ambos tratamientos durante los 10 días que duró el bioensayo. Al momento de la eclosión, las larvas del tratamiento control y el tratamiento T_3 midieron 8.43 ± 0.44 mm y 8.56 ± 0.52 mm respectivamente, y al 10 DDE alcanzaron una longitud total de 24.48 ± 4.42 mm y 24.55 ± 2.96 mm (Figura 11), lo que a su vez se traduce en una tasa de crecimiento de 1.60 ± 0.15 mm/día en el tratamiento control y de 1.59 ± 0.19 mm/día en el tratamiento T_3 .

Conjuntamente, se cuantificó la tasa de crecimiento de las larvas cada 2 días. En la Figura 12 se observa que la mayor tasa de crecimiento se registra a los 2 DDE (2.69 ± 0.24 mm/día tratamiento control; 2.73 ± 0.22 mm/día tratamiento T_3), y disminuye drásticamente a los 5 y 6 DDE (0.41 ± 0.11 mm/día tratamiento control; 0.32 ± 0.09 mm/día tratamiento T_3), una vez que se agotan las reservas vitelinas. Finalmente, la tasa de crecimiento vuelve a incrementarse a los 7 y 8 DDE (1.38 ± 0.19 mm/día tratamiento control; 1.64 ± 0.21 mm/día tratamiento T_3).

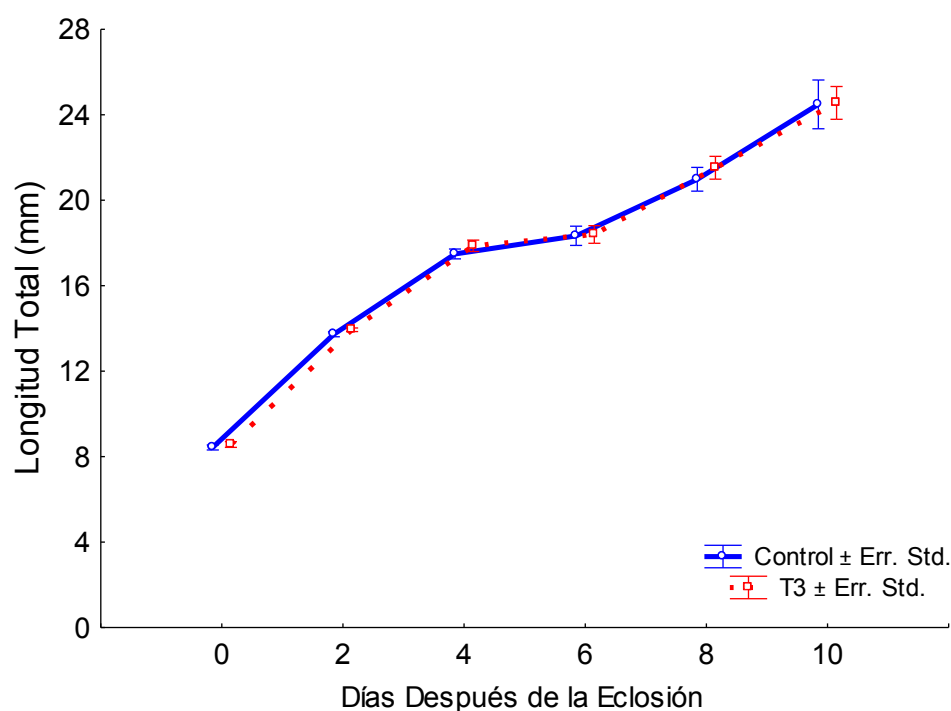


Figura 11. Longitud total (mm) de larvas de catán expuestas a la hormona T_3 en comparación con el tratamiento control.

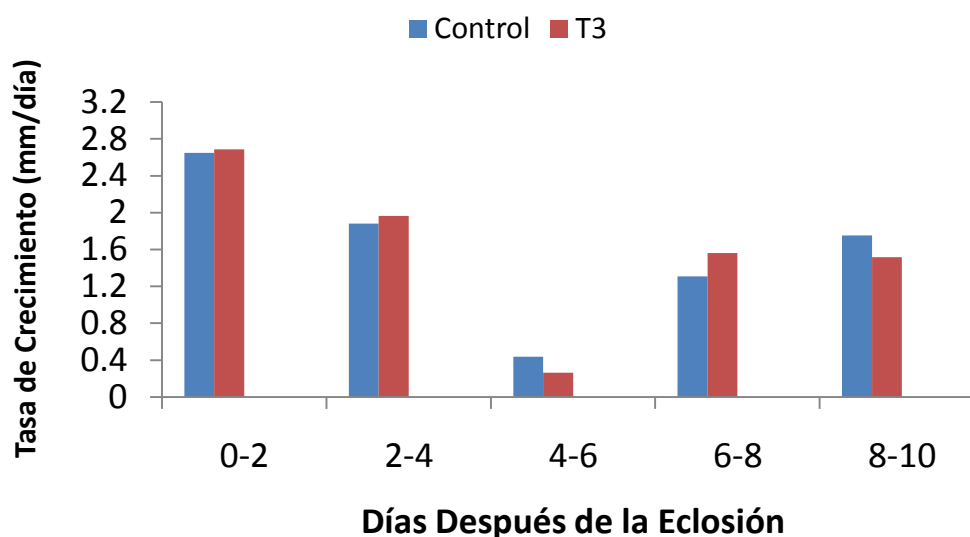


Figura 12. Tasa de crecimiento (mm/día) de las larvas de catán expuestas a la hormona T_3 en comparación con el tratamiento control. Se consideran periodos de dos días.

Al momento de la eclosión, el desarrollo del hocico en las larvas del tratamiento control y el tratamiento T_3 fue de $6.03 \pm 1.27\%$ y $6.41 \pm 0.97\%$ respectivamente, y se incrementó hasta alcanzar $12.41 \pm 1.86\%$ y $13.19 \pm 2.05\%$ al finalizar el bioensayo (Figura 13). Se encontró un incremento significativo de este índice (Anova, $F(5,167)=5.37$, $p<0.05$, $n=15$) en las larvas que fueron expuestas a la T_3 a los 6 y 8 DDE ($11.87 \pm 1.58\%$ 6 DDE; $12.79 \pm 2.18\%$ 8 DDE) en relación al tratamiento control ($10.13 \pm 1.87\%$ 6 DDE; $11.04 \pm 1.33\%$ 8 DDE).

Finalmente, la tasa de supervivencia de las larvas de catán al final del bioensayo fue mayor en el tratamiento T_3 ($78.18 \pm 7.44\%$) que en el control ($72.85 \pm 4.19\%$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas.

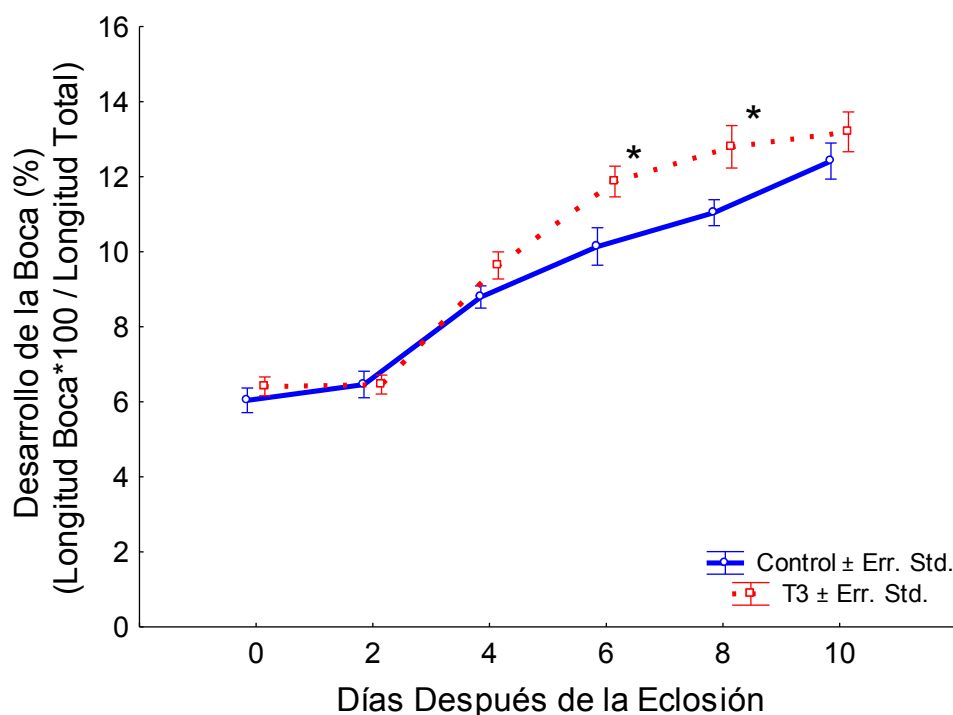


Figura 13. Longitud del hocico en relación a la longitud total (%) durante el desarrollo de larvas de catán expuestas a la hormona T_3 en comparación con el tratamiento control. El (*) indica diferencia significativa entre los tratamientos (Anova de 2 vías, $p < 0.05$).

VII.II.II. Pejelagarto pinto

Para evaluar el efecto de las hormonas tiroideas sobre la reproducción del pejelagarto pinto, se evaluó el porcentaje de desoves exitosos después de inyectar a los reproductores con T_3 , T_4 y TSH y se comparó con el control. El porcentaje más alto fue del 75% de desoves exitosos en los tratamientos T_4 y TSH, en el tratamiento T_3 se obtuvo un porcentaje del 60% y el control resultó en un porcentaje de desoves exitosos del 20%.

La tasa de eclosión para los tratamientos con T_3 , T_4 , TSH y control fue de $84.6 \pm 15.33\%$, $79.8 \pm 23.42\%$, $78.4 \pm 9.44\%$ y $64.83 \pm 7.13\%$, respectivamente. Sin embargo, únicamente se presentaron diferencias significativas entre el tratamiento T_3 y el control (Anova, $F(1,13)=6.48$, $p < 0.05$). En cuanto al diámetro de los huevos, los del tratamiento T_4 y TSH tuvieron un menor diámetro (3.94 ± 0.24

mm; 3.93 ± 0.13 mm) en comparación con el tratamiento T₃ y el control (4.09 ± 0.34 mm; 4.09 ± 0.22 mm).

El peso seco de las larvas al momento de la eclosión fue significativamente mayor (Anova, $F(3, 269)=3.80$, $p<0.05$) en el tratamiento control (4.24 ± 1.13 mg) en comparación con los tratamientos T₃, T₄ y TSH (3.80 ± 0.62 mg, 3.71 ± 1.28 mg y 3.68 ± 0.76 mg, respectivamente). Lo anterior, a su vez se ve reflejado en el tamaño del saco vitelino al momento de la eclosión, ya que el tratamiento control presentó el mayor tamaño ($73.17 \pm 7.06\%$) en comparación con los tratamientos T₃, T₄ y TSH ($65.03 \pm 8.31\%$, $67.65 \pm 10.54\%$ y $69.49 \pm 5.73\%$, respectivamente), aunque solo se presentaron diferencias significativas entre el tratamiento control y el tratamiento T₃ (Anova, $F(1, 18)=6.07$, $p<0.05$).

No se encontraron diferencias significativas en la longitud total de las larvas de los distintos tratamientos durante los 15 días que duró el bioensayo (Figura 14). Las larvas presentaron una tasa de crecimiento de 0.93 ± 0.16 mm/día (control), 0.90 ± 0.11 mm/día (T₃), 0.93 ± 0.18 mm/día (T₄) y 0.89 ± 0.10 mm/día (TSH).

Conjuntamente, se cuantificó la tasa de crecimiento de las larvas durante cada muestreo, es decir cada 3 días a partir de la eclosión. En la Figura 15 Las mayores tasas de crecimiento se presentan a los 4, 5 y 6 DDE (1.82 ± 0.15 mm/día - control; 1.76 ± 0.19 mm/día - T₃; 1.54 ± 0.29 mm/día - T₄; 1.79 ± 0.21 mm/día - TSH) y a partir de ese momento, la tasa disminuye gradualmente una vez que se agotan las reservas vitelinas.

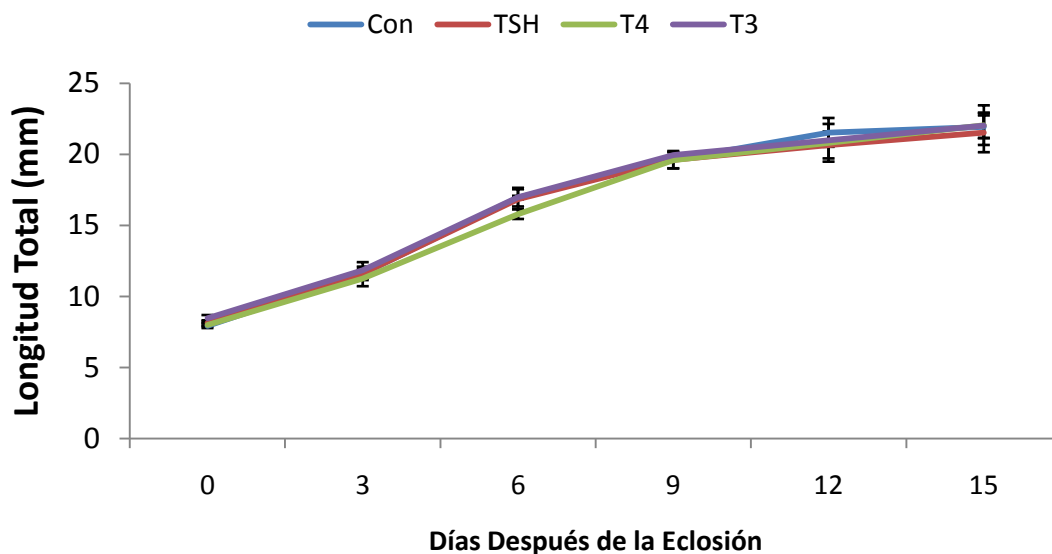


Figura 14. Longitud total (mm) de larvas de pejelagarto pinto provenientes de hembras inyectadas con hormonas tiroideas (T_3 , T_4 y TSH) en comparación con el tratamiento control.

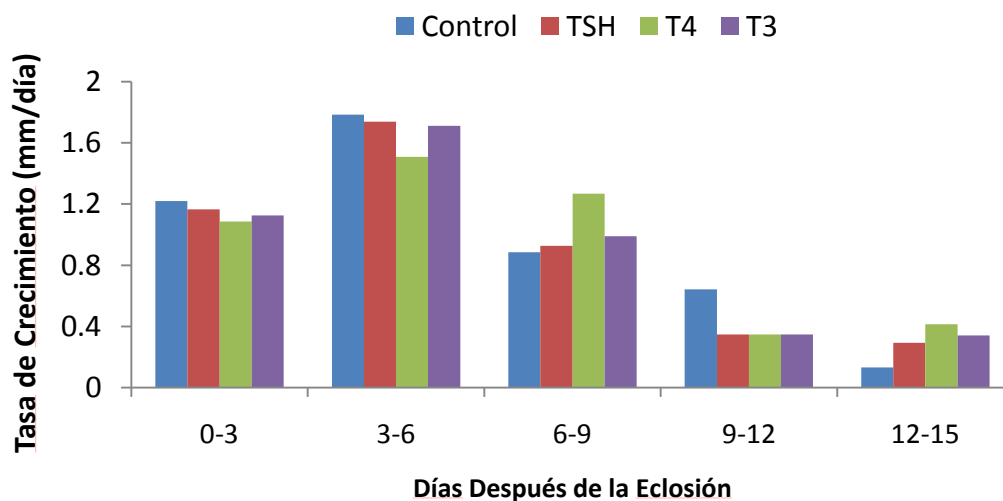


Figura 15. Tasa de crecimiento (mm/día) en larvas de pejelagarto pinto provenientes de hembras inyectadas con hormonas tiroideas (T_3 , T_4 y TSH) en comparación con el tratamiento control, para intervalos de tres días.

Como un índice morfométrico para evaluar el efecto de las hormonas tiroideas sobre el desarrollo temprano, se evaluó el grado de desarrollo del hocico en relación con la longitud total de las larvas (Figura 16). Al momento de la eclosión, el desarrollo del hocico en el tratamiento control y los tratamientos T₃, T₄ y TSH fue de $5.45 \pm 0.18\%$, $5.10 \pm 0.08\%$, $4.85 \pm 0.10\%$ y $4.79 \pm 0.11\%$, respectivamente. Al finalizar el bioensayo, el desarrollo del hocico fue mayor en los tratamientos con hormonas ($13.41 \pm 0.19\%$ - T₃; $12.79 \pm 0.42\%$ - T₄; $12.36 \pm 0.72\%$ - TSH) que en el tratamiento control ($12.01 \pm 0.06\%$), sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

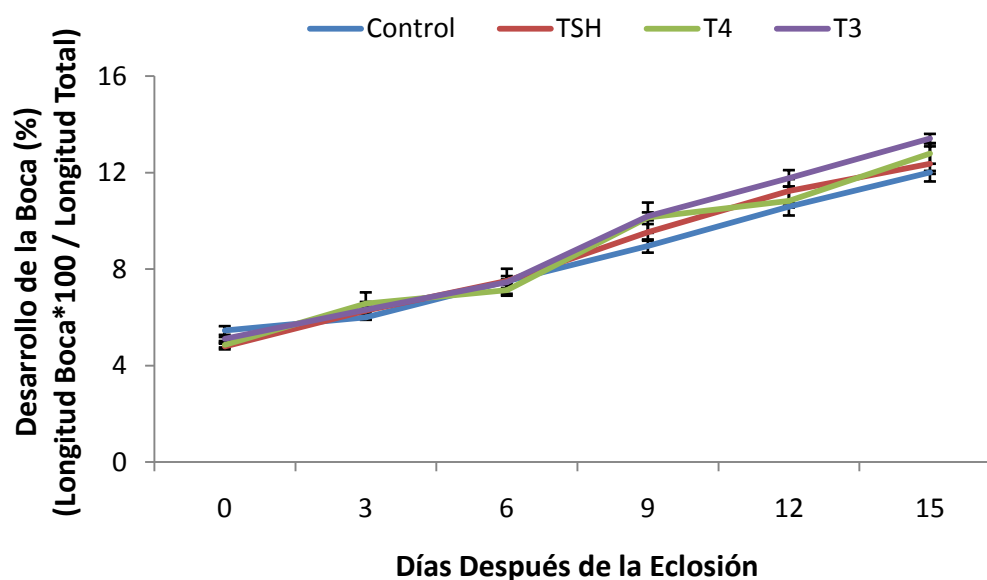


Figura 16. Longitud relativa del hocico de larvas del pejelagarto pinto (%) provenientes de hembras inyectadas con hormonas tiroideas (T₃, T₄ y TSH) en comparación con el tratamiento control.

En el caso del pejelagarto pinto, no se evaluó la supervivencia en el cultivo, sin embargo, se obtuvo un índice de supervivencia de las larvas en inanición (Figura 17). Después de 15 días, las larvas del tratamiento control presentaron un índice de supervivencia del 100%, mientras que en los tratamientos con hormonas tiroideas este índice disminuyó (94% T₄; 92.3% T₃; 81.1% TSH), aunque no se presentaron diferencias significativas.

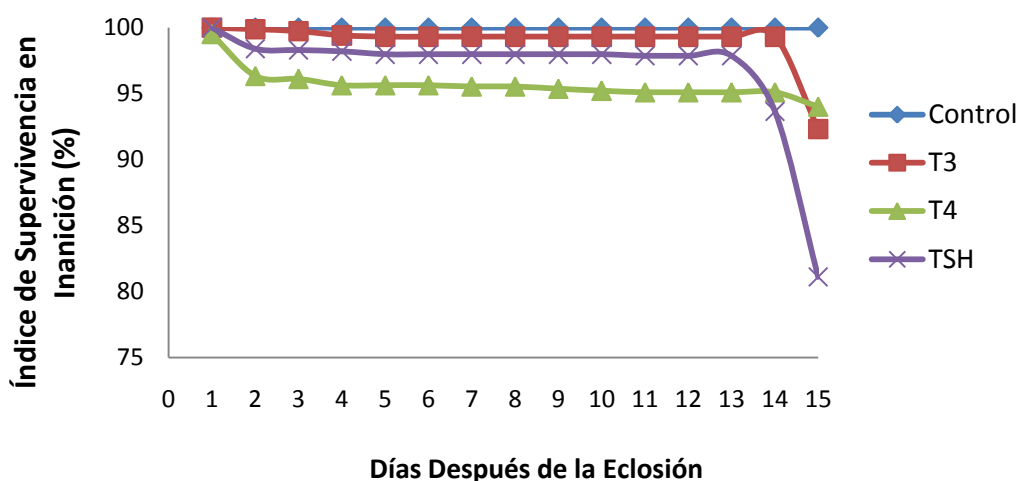


Figura 17. Índice de supervivencia en inanición (%) de larvas de pejelagarto pinto provenientes de hembras inyectadas con hormonas tiroideas (T_3 , T_4 y TSH) en comparación con el tratamiento control.

VII.III. Actividad de las enzimas digestivas

VII.III.I. Catán

La actividad proteolítica alcalina total en las larvas de catán se detectó a partir de los 4 DDE (Figura 18-A). La actividad de esas enzimas incrementó drásticamente a los 2 y 4 DDE además, la actividad detectada a los 4 DDE fue significativamente mayor (Anova de 2 vías, $F(5,58)=2.91$, $p<0.05$, $n=6$) en las larvas del tratamiento T_3 (33.78 ± 5.36 U/larva) que en las larvas control (18.03 ± 5.28 U/larva). Por otra parte, a los 10 DDE la actividad en el tratamiento T_3 disminuyó, mientras que en el control aumentó.

En cuanto a la actividad proteolítica ácida total (Figura 19-A), se presentó una tendencia similar a la actividad alcalina. De igual forma, se cuantificó una mayor actividad a los 4 DDE en las larvas del tratamiento T_3 (334.83 ± 32.31 U/larva) en relación a las del control (230.24 ± 49.76 U/larva), sin embargo esta diferencia no fue significativa. Al igual que en la actividad alcalina, a los 10 DDE la actividad ácida en el tratamiento control aumentó.

Al igual que para las otras enzimas evaluadas, la actividad tipo tripsina se detectó a partir de los 4 DDE (Figura 20-A). Sin embargo, después fue

disminuyendo gradualmente durante el desarrollo de las larvas. Se presentó una actividad significativamente mayor (Anova de 2 vías, $F(5,58)=2.71$, $p<0.05$, $n=6$) a los 4 DDE en las larvas del tratamiento T_3 (23.00 ± 3.63 U/larva) que en las del control (13.93 ± 4.37 U/larva).

La actividad tipo leucina-aminopeptidasa se incrementó gradualmente durante el desarrollo de las larvas a partir de los 2 DDE (Figura 21-A). Además, la actividad de esta enzima en las larvas del tratamiento T_3 fue significativamente mayor (Anova de 2 vías, $F(5,58)=3.04$, $p<0.05$, $n=6$) a los 4 y 6 DDE (5.91 ± 0.54 U/larva y 6.48 ± 0.30 U/larva, respectivamente) en comparación con la encontrada en el tratamiento control (3.92 ± 1.03 U/larva y 3.61 ± 0.93 U/larva, respectivamente).

Por otra parte, la actividad específica (U/mg de proteína) de todas las enzimas evaluadas (Figura 18-B, 19-B, 20-B y 21-B) no presentó diferencias significativas entre los tratamientos. Esta actividad resultó con una tendencia similar a la de la actividad total (U actividad/larva).

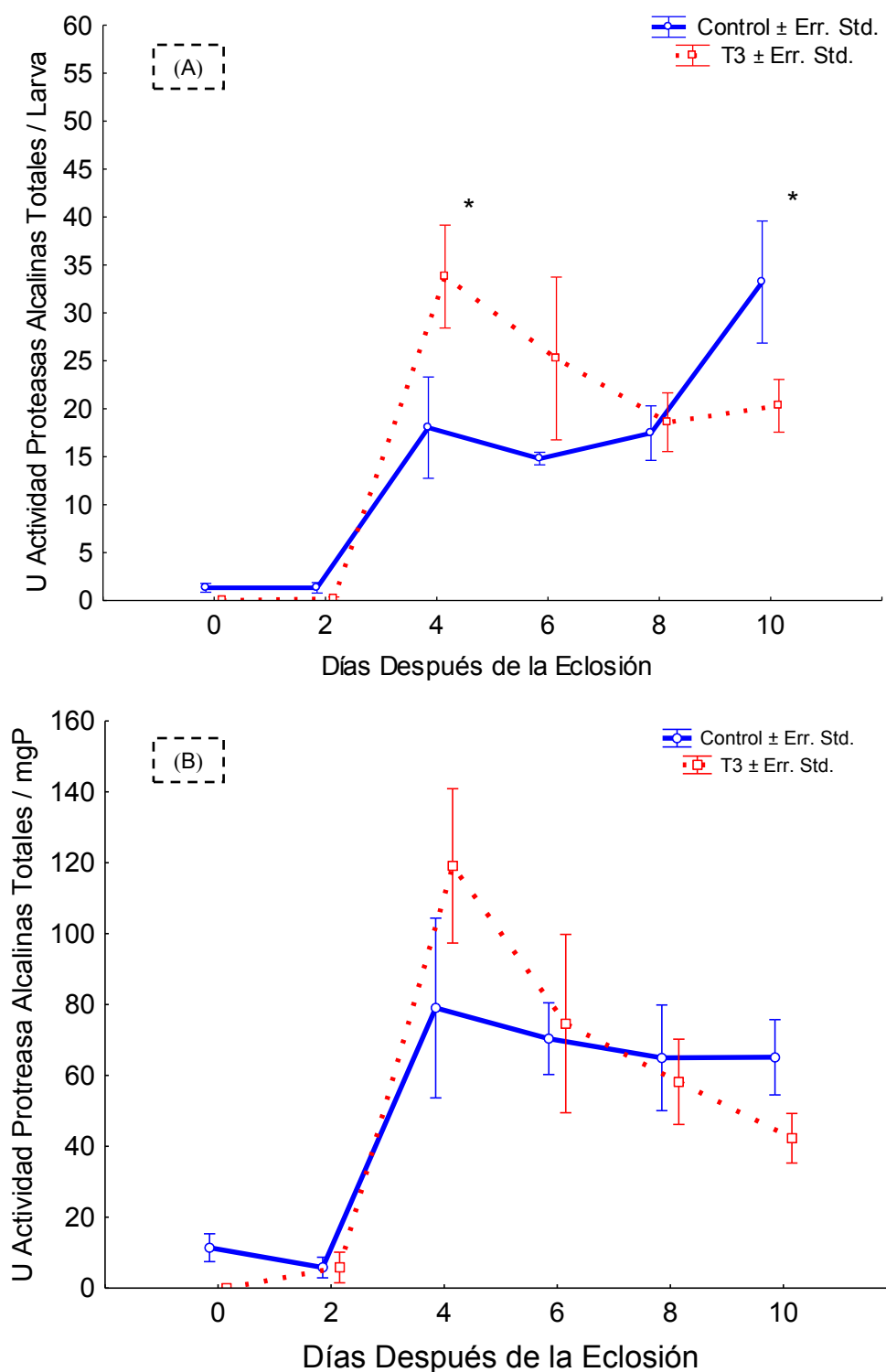


Figura 18. Actividad proteolítica alcalina total durante el desarrollo de larvas de catán expuestas a la hormona T_3 en comparación con el tratamiento control. (A) Actividad total (U/larva); (B) Actividad específica (U/mgP). El (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, $p < 0.05$).

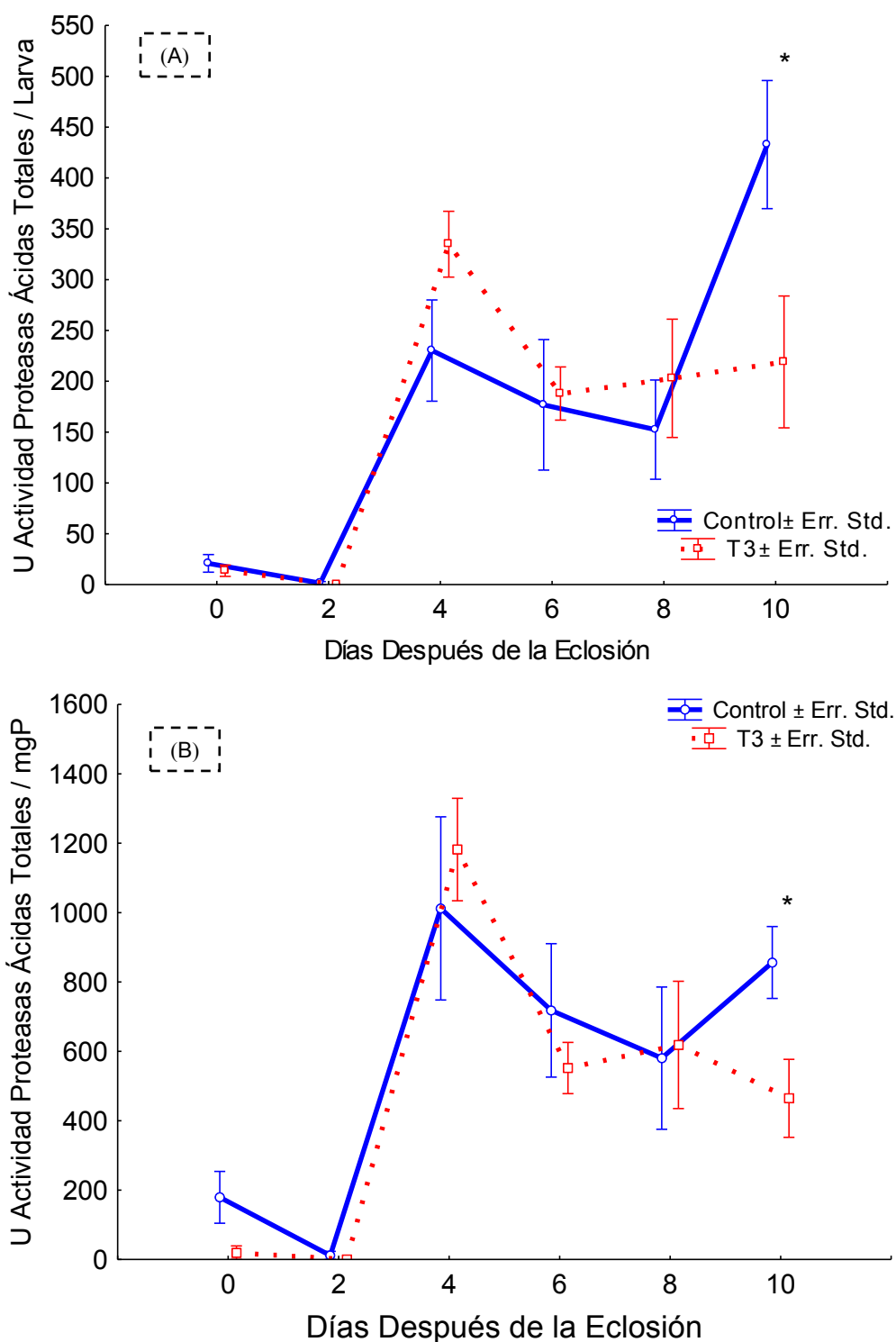


Figura 19. Actividad proteolítica ácida total durante el desarrollo de larvas de catán expuestas a la hormona T_3 en comparación con el tratamiento control. (A) Actividad total (U/larva); (B) Actividad específica (U/mgP). El (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, $p < 0.05$).

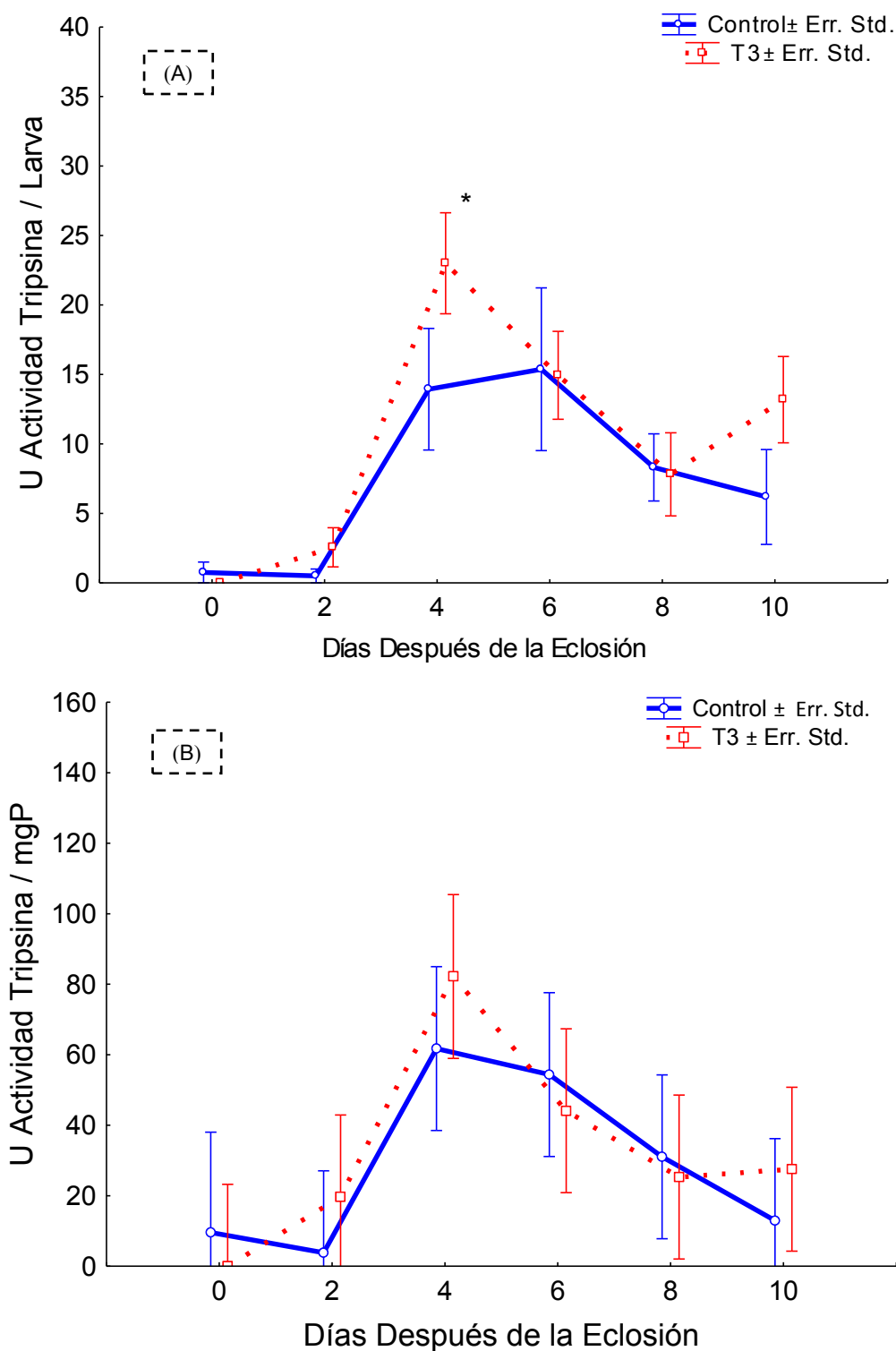


Figura 20. Actividad tipo tripsina durante el desarrollo de larvas de catán expuestas a la hormona T_3 en comparación con el tratamiento control. (A) Actividad total (U/larva); (B) Actividad específica (U/mgP). El (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, $p < 0.05$).

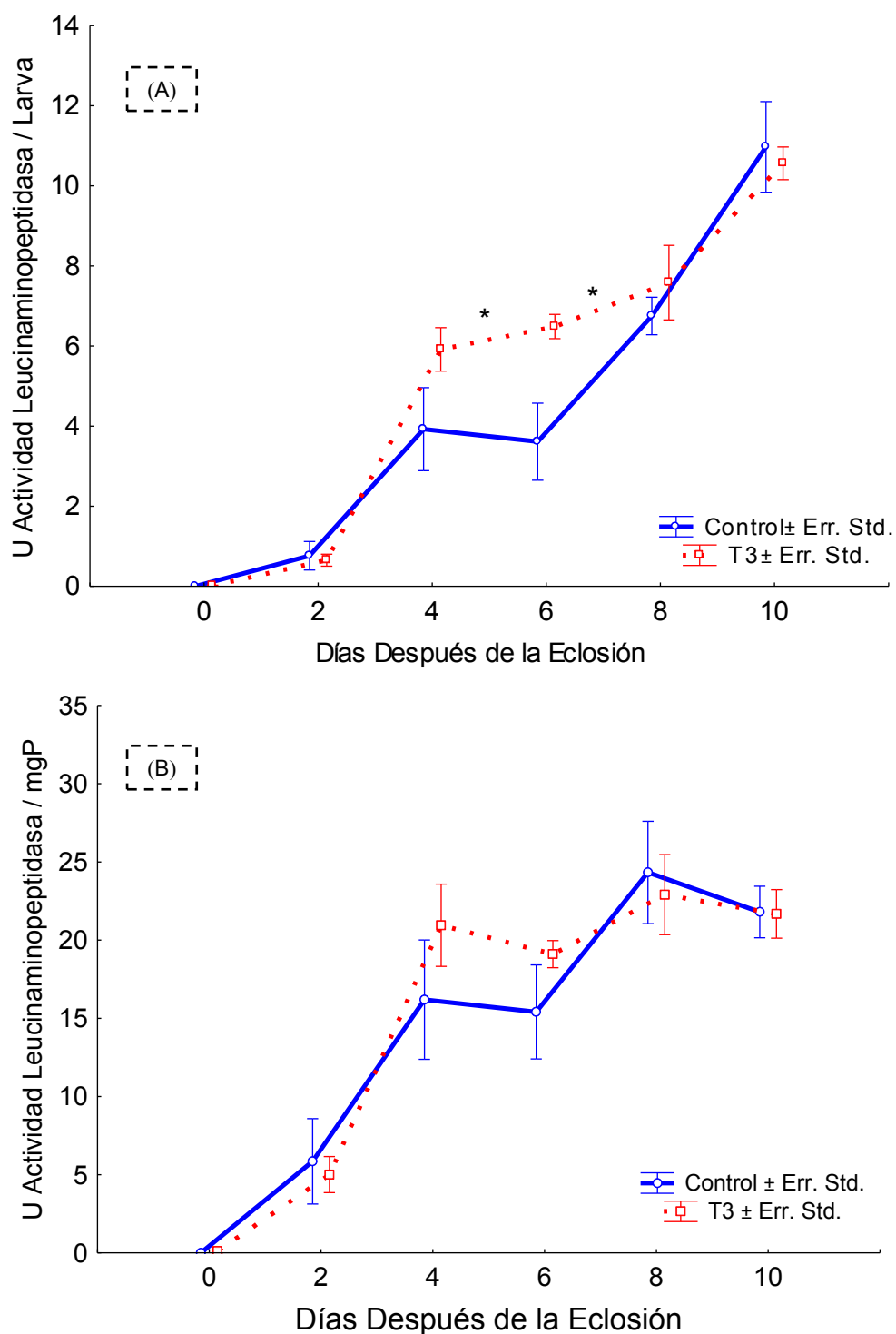


Figura 21. Actividad tipo leucina-aminopeptidasa durante el desarrollo de larvas de catán expuestas a la hormona T_3 en comparación con el tratamiento control. (A) Actividad total (U/larva); (B) Actividad específica (U/mgP). El (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, $p < 0.05$).

VII.III.II. Pejelagarto pinto

La actividad proteolítica alcalina total en las larvas de pejelagarto pinto se detectó desde el momento de la eclosión, aunque a muy bajos niveles (Figura 22-A). La actividad se incrementó significativamente (Anova de 2 vías, $F(15,143)=2.71$, $p<0.05$) en las larvas de los tratamientos con hormonas tiroideas a los 9 DDE (6.47 ± 1.41 U/larva T_3 ; 6.74 ± 2.00 U/larva T_4 ; 6.68 ± 2.71 U/larva TSH), comparadas con la actividad del tratamiento control (2.27 ± 0.87 U actividad/larva). La actividad específica (Figura 22-B) en las larvas de los tratamientos T_3 y control fue mayor al momento de la eclosión, debido a la poca cantidad de proteína en relación a la actividad detectada. Sin embargo, a los 2 DDE la actividad disminuyó y se mantuvo relativamente constante durante el desarrollo de las larvas.

La actividad proteolítica ácida total (Figura 23-A) se detectó a los 6 DDE y alcanzó la máxima actividad a los 9 DDE (6.47 ± 1.41 U/larva T_3 ; 6.74 ± 2.00 U/larva T_4 ; 6.68 ± 2.71 U/larva TSH; 6.47 ± 1.41 U/larva control), aunque no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. La actividad específica (Figura 23-B) se comportó de manera similar a la actividad total.

En el caso de la actividad tipo tripsina, se presentó un incremento gradual durante el desarrollo de las larvas a partir de los 3DDE (Figura 24-A). Además, a los 6 DDE, la actividad en las larvas provenientes de los tratamientos con hormonas tiroideas fue significativamente mayor (Anova de 2 vías, $F(15,135)=3.13$, $p<0.001$) (4.56 ± 1.38 U/larva T_3 ; 2.85 ± 0.46 U/larva T_4 ; 2.96 ± 0.55 U/larva TSH), en comparación con el tratamiento control (0.7 ± 0.20 U actividad/larva control). A diferencia de la actividad total, la actividad específica se mantuvo relativamente consistente durante el desarrollo de las larvas (Figura 24-B).

Finalmente, al igual que la actividad tipo tripsina, la actividad tipo leucina-aminopeptidasa se fue incrementado gradualmente durante el desarrollo de las larvas a partir de los 3 DDE (Figura 25-A). Asimismo, a los 3 y 9 DDE, la actividad en las larvas provenientes de los tratamientos T_3 y T_4 fue significativamente mayor en comparación con el tratamiento TSH y control. A diferencia de la actividad total, la actividad específica se mantuvo relativamente consistente (Figura 25-B).

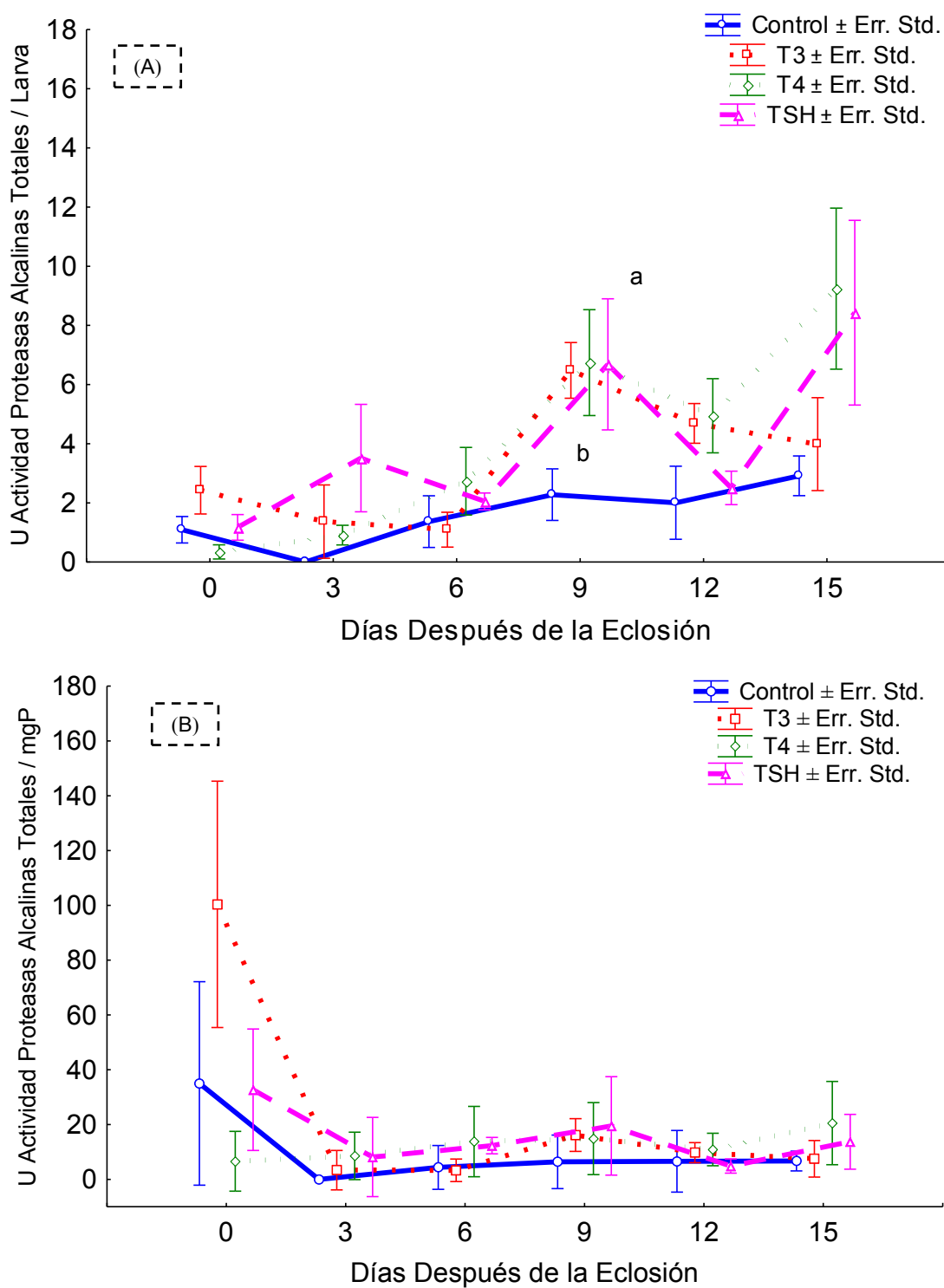


Figura 22. Actividad proteolítica alcalina total durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto provenientes de hembras inyectadas con hormonas tiroideas (T_3 , T_4 y TSH) en comparación con el tratamiento control. (A) Actividad total (U/larva); (B) Actividad específica (U/mgP). Distintos superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, $p < 0.05$).

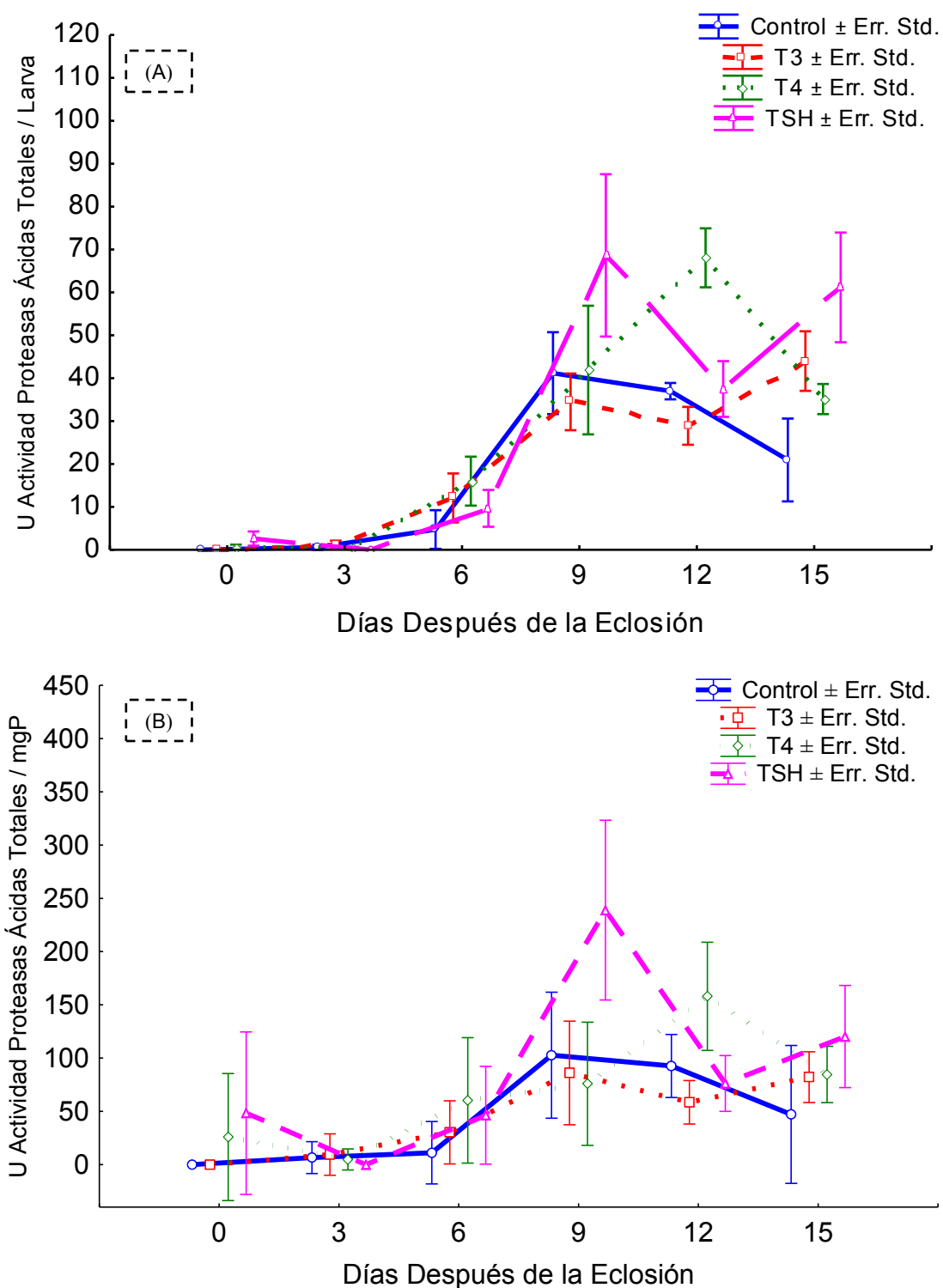


Figura 23. Actividad proteolítica ácida total durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto provenientes de hembras inyectadas con hormonas tiroideas (T_3 , T_4 y TSH) en comparación con el tratamiento control. (A) Actividad total (U/larva); (B) Actividad específica (U/mgP).

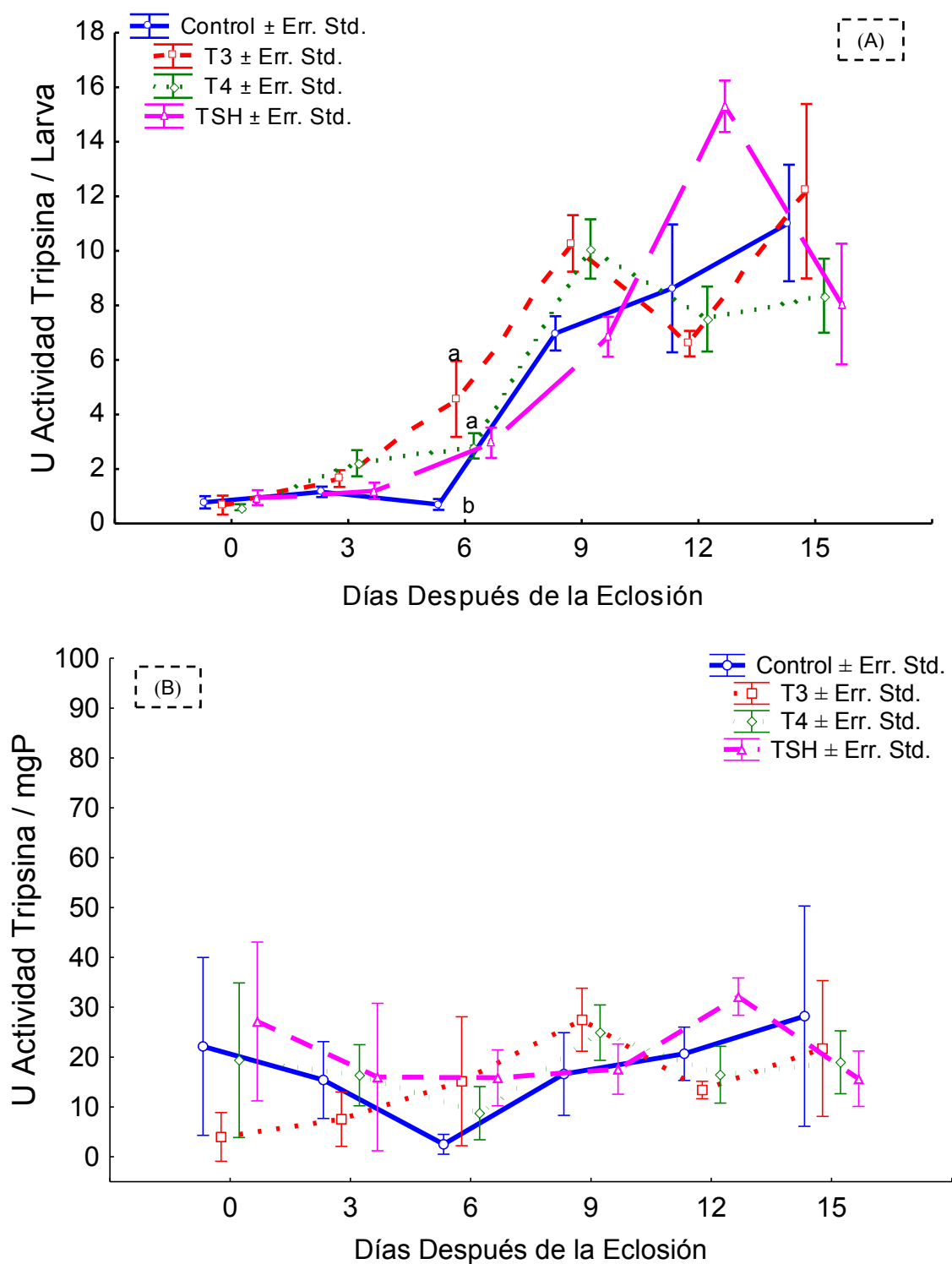


Figura 24. Actividad tipo tripsina durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto provenientes de hembras inyectadas con hormonas tiroideas (T_3 , T_4 y TSH) en comparación con el tratamiento control. (A) Actividad total (U/larva); (B) Actividad específica (U/mgP). Distintos superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, $p < 0.05$).

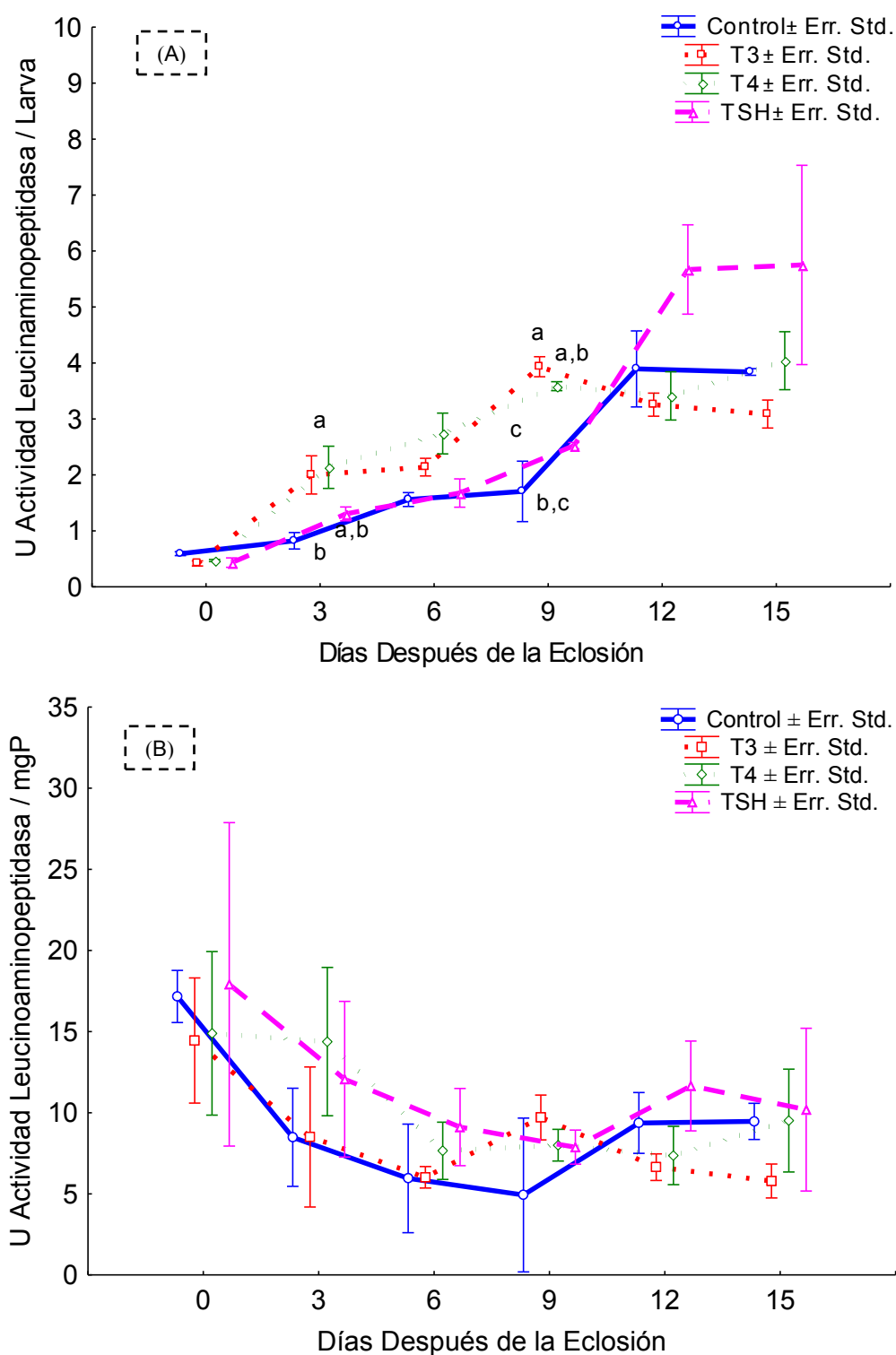


Figura 25. Actividad tipo leucina-aminopeptidasa durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto provenientes de hembras inyectadas con hormonas tiroideas (T₃, T₄ y TSH) en comparación con el tratamiento control. (A) Actividad total (U/larva); (B) Actividad específica (U/mgP). Distintos superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, p<0.05).

VII.IV. Cuantificación de ácidos nucleicos

VII.IV.I. Catán

La relación RNA:DNA en las larvas de catán al momento de la eclosión expuestas a la hormona T_3 fue de 5.05 ± 0.22 , y no se presentaron diferencias significativas con respecto a las larvas del tratamiento control, la cual fue de 5.20 ± 0.27 . Posteriormente, esta relación se mantuvo relativamente constante durante el desarrollo de las larvas (Figura 26).

En cuanto a la relación DNA:Peso Seco y la relación RNA:Peso Seco (Figura 27 y 28), se observó una mayor cantidad de DNA y RNA en relación al peso en las larvas del tratamiento T_3 al momento de la eclosión (553.12 ± 28.77 ; $2,794.46 \pm 146.58$) con respecto al tratamiento control (412.84 ± 10.50 ; $2,146.63 \pm 45.19$). En ambos tratamientos las relaciones fueron disminuyendo conforme avanzó el desarrollo de las larvas.

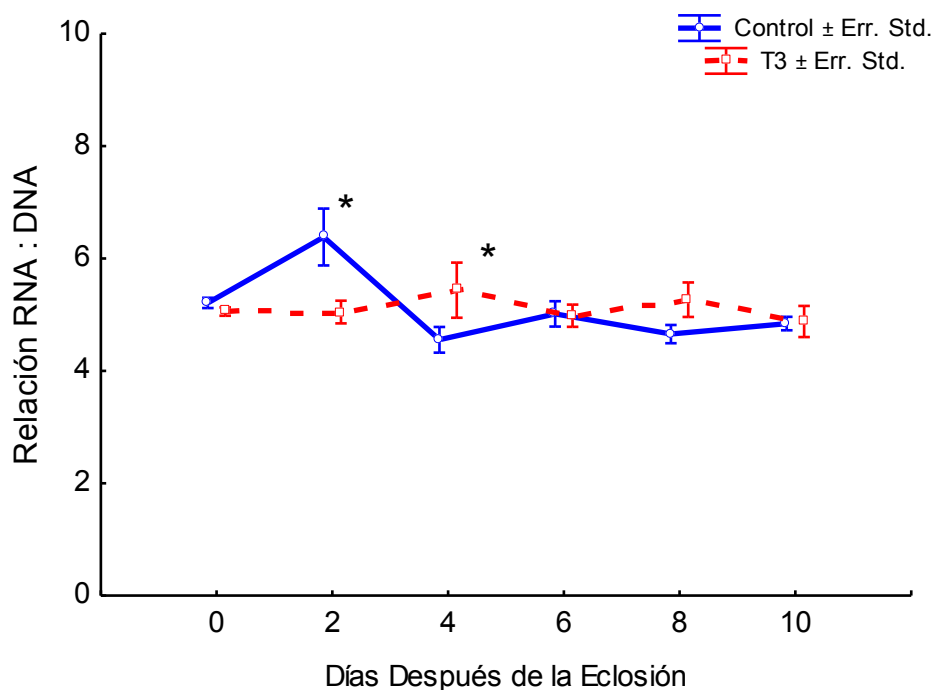


Figura 26. Relación RNA:DNA durante el desarrollo de larvas de catán expuestas a la hormona T_3 en comparación con el tratamiento control. El (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, $p < 0.05$).

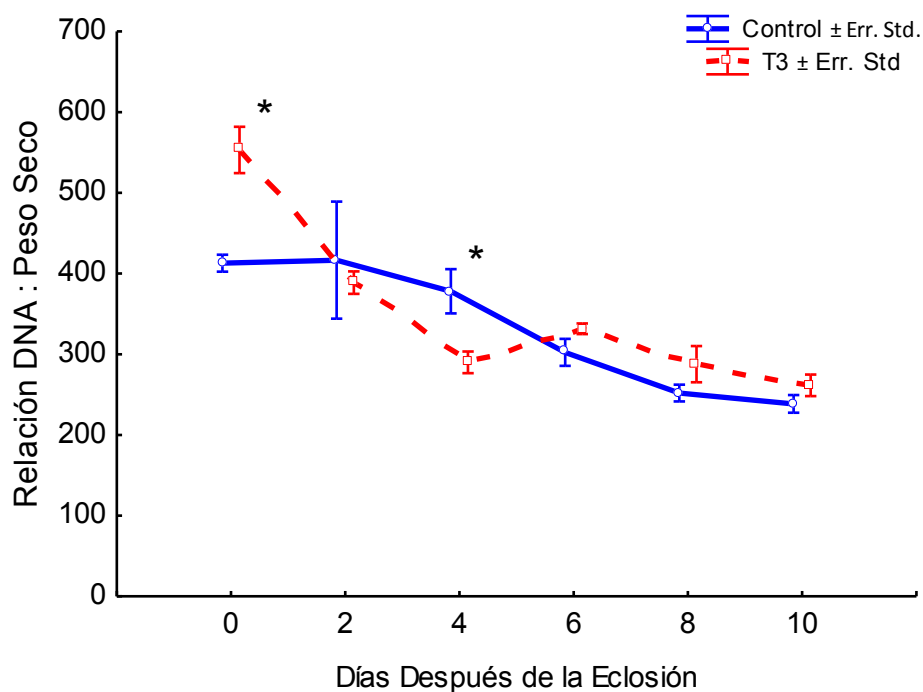


Figura 27. Relación DNA:Peso Seco durante el desarrollo de larvas de catán expuestas a la hormona T_3 en comparación con el tratamiento control. El (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, $p < 0.05$).

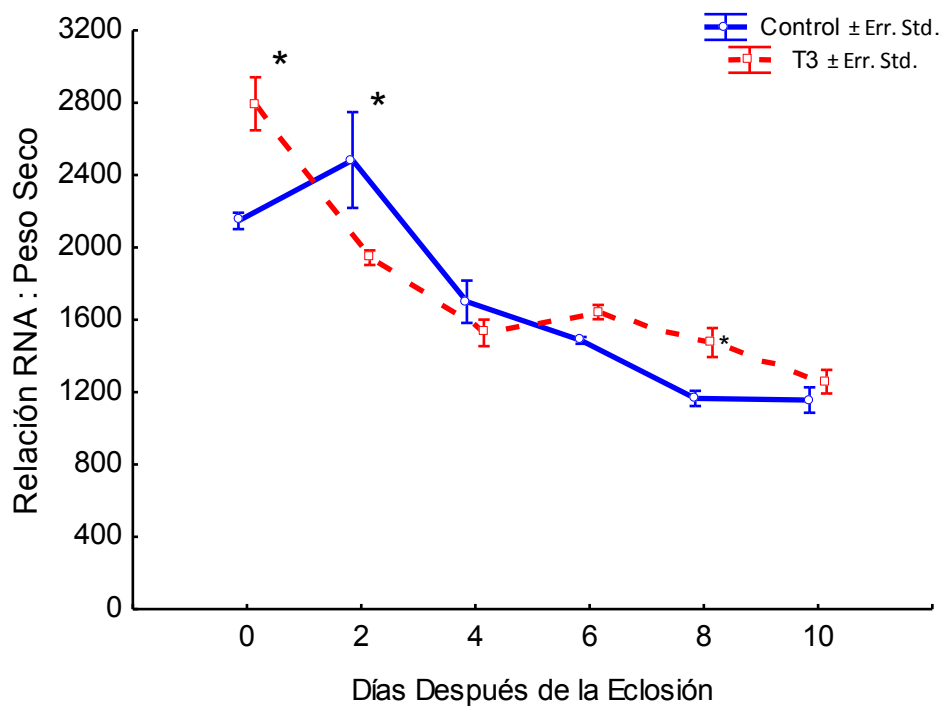


Figura 28. Relación RNA:Peso Seco durante el desarrollo de larvas de catán expuestas a la hormona T_3 en comparación con el tratamiento control. El (*) indica diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, $p < 0.05$).

VII.IV.II. Pejelagarto pinto

La relación RNA:DNA en las larvas recién eclosionadas de pejelagarto pinto provenientes de los tratamientos con hormonas tiroideas fue significativamente mayor (Anova de 2 vías, $F(15,154)=7.48$, $p<0.001$) que en las larvas del tratamiento control (3.39 ± 0.31 T₃; 2.78 ± 0.32 T₄; 2.81 ± 0.22 TSH; 1.36 ± 0.07 control). Sin embargo, al igual que en el catán, no se apreció un aumento de la relación RNA:DNA durante todo el desarrollo larvario. Además, no se apreció un efecto claro de las hormonas tiroideas (Figura 29).

En la relación RNA:Peso Seco (Figura 30) se observó una mayor cantidad de RNA en relación al peso en las larvas de los tratamientos con hormonas tiroideas al momento de la eclosión, con respecto al tratamiento control ($1,085.61 \pm 126.99$ - T₃; $1,312 \pm 106.66$ - T₄; $1,482 \pm 249.46$ - TSH; 923.08 ± 125.43 - control). Sin embargo, en el caso de la relación DNA:Peso Seco (Figura 40), se observó un efecto contrario, ya que las larvas del tratamiento control presentaron mayor cantidad de DNA en relación al peso al momento de la eclosión (331.26 ± 25.47 T₃; 508.60 ± 61.66 T₄; 487.93 ± 65.19 TSH; 663.21 ± 140.03 control).

Ambas relaciones fueron disminuyendo hasta los 6 DDE, para después mantenerse consistentes durante el resto del desarrollo de las larvas. Sin embargo, en los tratamiento con hormonas tiroideas se presentó un ligero pero significativo incremento de la relación DNA:Peso Seco a los 3 y 6 DDE, y de la relación RNA:Peso Seco desde la eclosión hasta los 9 DDE.

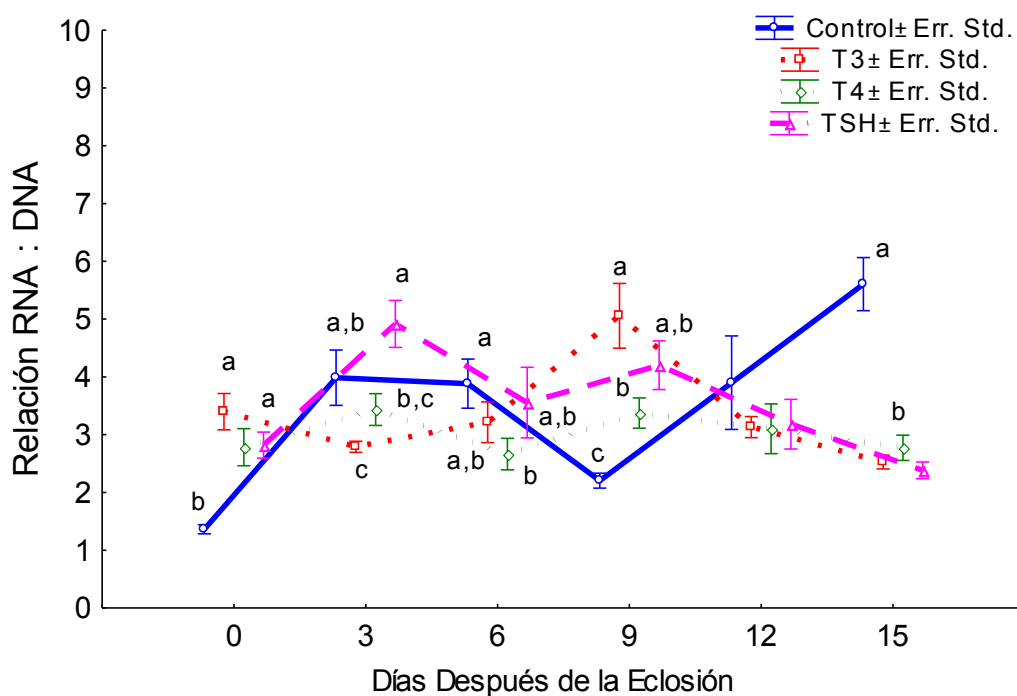


Figura 29. Relación RNA:DNA durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto provenientes de hembras inyectadas con hormonas tiroideas (T_3 , T_4 y TSH) en comparación con el tratamiento control. Distintos superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, $p < 0.05$).

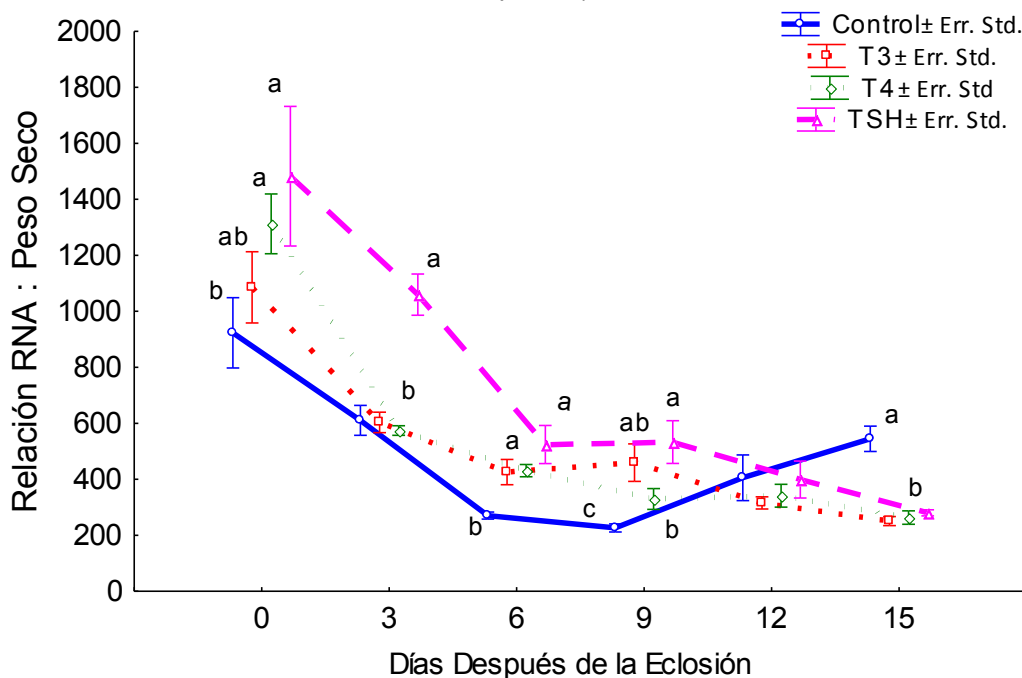


Figura 30. Relación RNA:Peso Seco durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto provenientes de hembras inyectadas con hormonas tiroideas (T_3 , T_4 y TSH) en comparación con el tratamiento control. Distintos superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, $p < 0.05$).

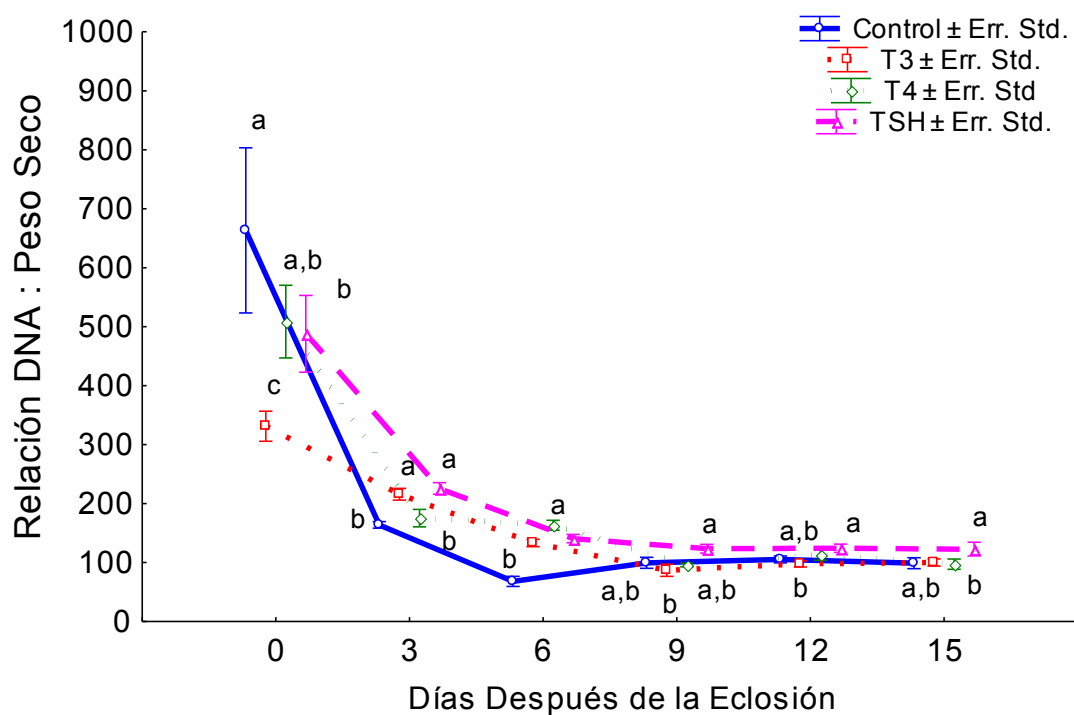


Figura 31. Relación DNA:Peso Seco durante el desarrollo de larvas de pejelagarto pinto provenientes de hembras inyectadas con hormonas tiroideas (T_3 , T_4 y TSH) en comparación con el tratamiento control. Distintos superíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos (Anova de 2 vías, $p < 0.05$).

VIII. Discusión

VIII.I. Fisiología tiroidea en catán y pejelagarto pinto

Transferencia de las hormonas tiroideas a los huevos

Existen diferentes alternativas para administrar las hormonas tiroideas a las larvas de peces. En este estudio se optó por evaluar dos metodologías de administración distintas: la administración directa a los huevos y la administración por vía materna. Ambos métodos de administración ocasionaron un incremento significativo en la concentración de hormonas tiroideas en los huevos. Sin embargo, al administrar la hormona T_3 de manera directa, la concentración de las hormonas T_3 y T_4 en los huevos fue mayor que cuando se administraron por el método de inyección materna. Esto posiblemente se debe a que la hormona T_3 es una molécula orgánica de bajo peso molecular que por su composición iónica tiene la capacidad de atravesar la membrana celular (Power *et al.*, 2001). Al exponer los huevos a una inmersión directa de T_3 (1 ppm – 2 horas), es probable que la diferencia de gradientes haya provocado que la hormona atravesara la cubierta de los huevos en gran cantidad.

Es importante destacar que al administrar la hormona T_3 a los huevos, también se presentó un incremento significativo en la concentración de la hormona T_4 , la cual es un precursor de la hormona T_3 , por lo que al incrementar la concentración de T_3 es probable que se presente una regulación negativa de la conversión de T_4 a T_3 , y por consecuencia se incrementa también la concentración de T_4 en el huevo. Esto sugeriría que los embriones de catán y pejelagarto pinto cuentan con un mecanismo funcional de conversión de T_4 a T_3 , seguramente por medio de la enzima 5'-monodesiodinasa como lo indican Walpita *et al.* (2007) para el pez zebra.

De acuerdo con el incremento en la concentración de hormonas tiroideas encontrada en los huevos de ambas especies en respuesta a la administración de T_3 , se puede concluir que el método de aplicación directa incrementa en mayor

medida la cantidad de hormona disponible para las larvas, ya que hay una mayor transferencia. Sin embargo, uno de los problemas al aplicar las hormonas de esta manera, que si bien no se presentó en este trabajo, sí se ha reportado en otros estudios, es la aparición de malformaciones y mortalidad alta en las larvas de algunas especies (Nacario, 1983; Mendoza *et al.*, 2002; Walpita *et al.*, 2007), probablemente debido a una sobredosis (Lam, 1994). Esto sugiere una regulación de la cantidad de hormonas maternas que se depositan en el huevo y que son necesarias para el desarrollo temprano.

Aguilera (1999) administró hormonas tiroideas de manera directa a las larvas de catán, y reportó que agregar la hormona T_3 al agua (0.1 ppm) elevó la mortalidad de las larvas, y sugirió que ocurrió una sobredosis. Esto probablemente se deba a que la hormona se mantuvo en el agua durante todo el cultivo y por lo tanto fue demasiado tiempo de exposición. De manera general, la aplicación de las hormonas tiroideas se hace mediante una balneación durante un periodo corto de tiempo (Landines *et al.*, 2010), como en el caso de este estudio.

Transferencia materna de hormonas tiroideas

Como una alternativa para la administración hormonal, se han realizado diversos estudios aplicando hormonas tiroideas a través de una inyección a las hembras maduras, en un momento previo a la inducción del desove. En todos ellos se ha observado un incremento significativo en la concentración de estas hormonas en los huevos (Brown *et al.*, 1989; Ayson y Lam, 1993; Tachihara *et al.*, 1997; Kang y Chang, 2004).

En este estudio, al inyectar las hormonas T_4 y T_3 a las hembras de pejelagarto pinto, también se incrementó significativamente el nivel de la hormona T_4 en los huevos. Esto indica la existencia de un mecanismo de transferencia materna de las hormonas tiroideas hacia el ovocito en esta especie. Sin embargo, hay diversas hipótesis sobre cómo es que estas hormonas se transfieren a los huevos. Algunos estudios indican que durante la vitelogénesis las hormonas tiroideas se unen a la vitelogenina y son transportadas al ovocito (MacKenzie *et*

al., 1987; Babin, 1992; Cyr y Eales, 1996; Monteverdi y Di Giulio, 2000; Kayaba *et al.*, 2008). Sin embargo, también se ha demostrado que estas hormonas pueden entrar al ovocito por medio de gradientes de concentración de manera independiente a la vitelogenina (Raine y Leatherland, 2003). Es posible que en los peces se presenten ambas formas de enriquecimiento, aunque debido al alto grado de asociación de las hormonas tiroideas con la vitelogenina (mayor al 80%) (Monteverdi y Di Giulio, 2000), es probable que esta sea la vía principal de incorporación a los huevos.

En este estudio no se evaluó la manera en que se transfirieron las hormonas tiroideas a los huevos de pejelagarto pinto. Sin embargo, se puede inferir que es un proceso ligado a la vitelogénesis y la fase final de maduración del huevo, ya que la concentración de la hormona T_4 encontrada en los ovocitos inmaduros fue significativamente menor a la de los huevos fertilizados.

Por otra parte, a diferencia de lo esperado, al inyectar la hormona T_3 a las hembras no se encontró un incremento significativo en su concentración en los huevos. Pese a esto, es probable que si se haya presentado una transferencia de T_3 , ya que si bien no se encontró un incremento significativo de esta hormona, sí se presentó un incremento significativo en la hormona T_4 . Esto indica que hubo menor conversión de T_4 a T_3 en los embriones de este tratamiento, probablemente porque durante algún punto del desarrollo contaron con una mayor cantidad de T_3 disponible, permitiendo de esta manera que la T_4 que ya se encontraba en los huevos no fuera utilizada.

En contraste con los resultados del presente estudio, Kang y Chang (2004) inyectaron T_3 a hembras de pez roca (*Sebastes schlegeli*) y encontraron un incremento significativo de esta hormona en los huevos. Ellos inyectaron T_3 cada semana durante un mes (20 mg/kg por inyección). Esto indica que, si bien en el pejelagarto pinto una inyección fue suficiente para apreciar un incremento significativo en la concentración de T_4 , tal vez sería necesario incrementar el número de aplicaciones previo al desove para de igual forma detectar un incremento en los niveles de T_3 en los huevos.

Finalmente, en el caso de la hormona TSH, en este estudio no fue posible cuantificar su concentración en los huevos y larvas. La TSH es una molécula peptídica de mayor peso molecular que no se esperaría que pasara a través de la cubierta del huevo por difusión. Al evaluar la concentración de T_3 y T_4 en los huevos provenientes de este tratamiento, no se encontró un incremento significativo con respecto al control. Sin embargo, al evaluar eventos posteriores en el desarrollo si se encontró un efecto positivo en las larvas provenientes de hembras inyectadas con TSH. Es posible que se haya reforzado el mecanismo de estimulación del eje tiroideo normal de las hembras de pejelagarto pinto (Yamano, 2005), permitiendo que la tiroides generara una mayor concentración de hormonas tiroideas que fueron transferidas a los embriones, aunque en menor cantidad por lo que no fue posible detectar un incremento significativo de su concentración. Otra posibilidad es que, a reserva de probarlo en un futuro, la hormona TSH se haya transferido a los embriones, y una vez que se desarrolló la glándula tiroides de la larva, se estimuló la síntesis de las hormonas tiroideas provocando efectos positivos en el desarrollo.

Concentración de hormonas tiroideas durante el desarrollo

Al cuantificar la concentración de hormonas tiroideas durante el desarrollo de las larvas de pejelagarto pinto y catán, se encontró que su concentración en los huevos aumentó significativamente. Sin embargo, una vez que eclosionaron las larvas (0 DDE) la concentración disminuyó al nivel de las larvas del tratamiento control. Este resultado difiere al encontrado para otras especies de peces, ya que posterior a la aplicación de las hormonas tiroideas se ha reportado una concentración elevada entre los 6 y 15 DDE (Brown *et al.*, 1989; Ayson y Lam, 1993; Tachihara *et al.*, 1997; Kang y Chang, 2004).

A diferencia de las especies de peces hasta ahora estudiadas, los lepisosteidos se caracterizan por un desarrollo mucho más acelerado, ya que entre los 10 y los 15 DDE ya son juveniles, con tasas de crecimiento de 1 a 5 mm/día (Mendoza *et al.*, 2008a). Esta puede ser la causa de que los niveles de T_3

y T_4 desciendan tan drásticamente después de la eclosión, ya que al contar con un metabolismo tan acelerado, es probable que la larva utilice rápidamente todas las hormona tiroideas previamente acumuladas, sobre todo porque las hormonas tiroideas promueven la síntesis y utilización de proteínas (Yamano, 2005).

Otro resultado importante es el incremento significativo de la hormona T_4 a los 2 DDE en el catán y a los 3 DDE en el pejelagarto pinto. Este incremento en la producción endógena de hormonas tiroideas, es indicativo del desarrollo precoz de una glándula tiroides funcional durante la etapa larval. Esto tiene sentido, ya que la concentración de hormonas tiroideas en los huevos del tratamiento control (hormonas provenientes únicamente de la madre) es relativamente baja, lo que sugiere la aparición de un eje tiroideo funcional desde muy temprano, como lo sugirieron Aguilera *et al.* (2010) para el catán. Al comparar la edad a la que inicia la producción de hormonas tiroideas en diferentes especies de peces, se encontró que generalmente coincide con el momento en que se reabsorbe casi por completo el saco vitelino (Yamano, 2005). El catán y el pejelagarto pinto no son la excepción a esta generalización, ya que el saco vitelino fue reabsorbido completamente a los 3 y 5 DDE respectivamente, lo cual coincide con el inicio de la producción de T_4 .

La concentración de T_4 cuantificada durante el desarrollo de las larvas de pejelagarto pinto y del catán, presentó valores más estables que los de T_3 . De manera general, en otras especies de peces también se ha reportado una mayor variabilidad en la concentración de T_3 que en la de T_4 . Esto probablemente se deba a que la actividad de la 5' monodesiodinasa, la cual controla la conversión de T_4 a T_3 , se ve afectada por un gran número de factores como la temperatura y la salinidad, pero sobre todo por los niveles postprandiales de glucosa (después de alimentación) y los niveles de cortisol (hormona del estrés) (Farbridge y Leatherland, 1992; Eales y Brown, 1993).

En el caso de la T_3 no se apreció un incremento en su concentración durante el desarrollo larvario, lo cual sugiere que la utilizan en cuanto es sintetizada. Estos resultados coinciden con el de Navarrete *et al.* (2011), quienes

no encontraron un incremento en los niveles de T_3 en los tejidos de juveniles de pez blanco (*Chirostoma estor*) después de suministrarles T_4 en el agua. Además, Raine *et al.* (2004) observaron que al administrar T_3 de manera continua a la trucha arcoíris, llega un momento en que la concentración de esta hormona deja de incrementarse en las larvas, lo cual sugiere que hay un mecanismo para evitar su acumulación excesiva. Esto puede ser mediante un proceso de deiodinización o la formación de T_3 reversa (rT_3) (Yamano, 2005).

La concentración de T_4 durante el desarrollo del catán se mantuvo estable, mientras que la del pejelagarto pinto aumentó gradualmente. Esto puede estar relacionado con el crecimiento más acelerado que se observa en el catán, en comparación con el pejelagarto pinto. Tanaka *et al.* (1995) reportaron que en el caso de las larvas de peces marinos, como el lenguado, se observa un incremento muy marcado de esta hormona durante la metamorfosis. Este incremento en la concentración de T_4 no se observó en las especies evaluadas en este estudio, lo cual puede deberse a que las larvas de los lepisosteidos no atraviesan por una metamorfosis tan marcada. No obstante, en ambas especies se observa un incremento en la concentración de T_4 a los 6 DDE, que coincide con un aumento en la actividad enzimática y un marcado cambio en la tasa de crecimiento.

VIII.II. Efecto de las hormonas tiroideas en catán y pejelagarto pinto

VIII.II.I. Reproducción, morfología y supervivencia

Efecto sobre la inducción del desove

El efecto de las hormonas tiroideas sobre la reproducción de los peces ha sido bien estudiado. En hembras de trucha arcoíris, el suministro de T_3 sola o en combinación con las gonadotropinas (GTH), ocasiona un incremento en el índice gonadosomático (Cyr y Eales, 1996). Estos autores concluyeron que la hormona T_3 actúa sinérgicamente con las GTH para mejorar el desarrollo del ovario, y por lo tanto tiene la capacidad de amplificar la acción de la GTH, posiblemente incrementado el número de receptores para estas glicoproteínas o bien modificando su afinidad. Además, se ha demostrado que la T_3 actúa de manera

independiente a las GTH, incrementado los niveles de AMP cíclico en las células foliculares, y que esto promueve la producción de testosterona y estradiol, y acelera la maduración final del ovario y los testículos, así como la ovulación (Eales y Brown, 1993; Bjornsson *et al.*, 1997; García *et al.*, 2004).

En este estudio, al inyectar las hormonas tiroideas justo antes de inducir el desove en las hembras de pejelagarto pinto, se incrementó de manera importante el porcentaje de desoves exitosos obtenidos. A reserva de evaluar variables como el índice gonadosomático o el crecimiento en volumen de los ovocitos (absorción de vitelogenina), los resultados de este estudio sugieren que en los lepisosteidos las hormonas tiroideas juegan un papel muy importante en la reproducción, en específico promoviendo el desove.

Efecto sobre la tasa de eclosión y desarrollo embrionario

El papel de las hormonas tiroideas de origen materno en el desarrollo embrionario ha sido objeto de considerable discusión en la literatura. Se propuso que estas hormonas simplemente pasaban a los huevos por difusión y no participaban en el desarrollo temprano de los peces. Esto llevó a la idea de que resultaba inútil adicionar estas hormonas a los huevos, ya que desde el punto de vista de la selección natural sería poco probable que esto produjera efectos positivos en el embrión (Cyr y Eales, 1996).

Hoy en día se sabe que los embriones cuentan con la maquinaria necesaria para utilizar las hormonas tiroideas y que además, al adicionar estas hormonas se crean efectos positivos en el desarrollo temprano, acelerando la tasa de eclosión y la pigmentación del embrión (Walpita *et al.*, 2007). En el caso del catán y el pejelagarto pinto, no se evaluó el efecto en el tiempo que tardaron en eclosionar los embriones. Sin embargo, se evaluó la tasa de eclosión en los distintos tratamientos, como una medida para evaluar la calidad del huevo. No se encontraron estudios que indiquen un efecto positivo de las hormonas tiroideas sobre la tasa de eclosión en peces. En el catán no se apreció un efecto de la hormona T₃ sobre esta variable. Sin embargo, al evaluar la tasa de eclosión del

pejelagarto pinto, se encontró un incremento significativo en la eclosión de los huevos provenientes de hembras inyectadas con hormonas tiroideas. Esto representa un importante beneficio, ya que al aplicar las hormonas antes de la fertilización del ovocito, se logra mejorar la tasa de eclosión.

En cuanto al diámetro de los huevos, no se apreció un efecto significativo de las hormonas en el pejelagarto pinto, es posible que las diferencias observadas estuvieran relacionadas con la variabilidad inherente a cada desove. Sin embargo, en el catán sí se observó un incremento significativo en el diámetro de los huevos del tratamiento con T_3 . Todos los huevos utilizados en este bioensayo provinieron de un desove único, por lo que esta variación probablemente tuvo que ver con la acumulación de T_3 en el interior de los huevos, lo que a su vez pudo provocar un gradiente de concentración que promovió la entrada de agua y por lo tanto se incrementó el tamaño de los huevos de este tratamiento.

Finalmente, otra variable utilizada para evaluar el efecto de las hormonas tiroideas sobre el desarrollo embrionario fue el tamaño del saco vitelino al momento de la eclosión. En este caso, para ambas especies se encontró una disminución en el tamaño del saco vitelino de las larvas a las que se les administraron hormonas tiroideas en comparación con el control. Esto indica que las hormonas aceleraron el metabolismo y en consecuencia la utilización de las reservas vitelinas, como ha sido reportado en otras especies de peces (Tanaka *et al.*, 1995).

Efecto en el crecimiento

Diversos estudios reportan un incremento significativo en el crecimiento de larvas de distintas especies de peces después de administrar hormonas tiroideas (Tabla 1). Estas hormonas actúan principalmente promoviendo el crecimiento esquelético y la tasa de conversión alimenticia. Sin embargo, Kuzmina *et al.* (2010) reportaron que en el rutilo (*Rutilus rutilus*) el crecimiento se vio reducido al administrar T_3 debido a que toda la energía metabólica se utilizó en procesos de desarrollo de órganos y tejidos, en lugar de crecimiento esquelético. De la misma

manera, Mendoza *et al.* (2003), reportaron larvas más pequeñas y con deformidades a concentraciones altas de T₃. Estos resultados contradictorios indican que probablemente los efectos de las hormonas tiroideas en el crecimiento son especie-específicos y dependen de la dosis utilizada.

En el caso del catán y el pejelagarto pinto, no se encontró un efecto de las hormonas tiroideas sobre el crecimiento larvario. Esto tal vez se deba a que hormonas administradas a los huevos se consumieron muy rápido a causa del metabolismo acelerado de estas especies, y que por lo tanto no fue suficiente para afectar los procesos de crecimiento esquelético. Aguilera (1999) administró estas hormonas al catán durante un periodo más prolongado que el de este estudio, y tampoco encontró un efecto sobre la longitud total de las larvas. Esto sugiere que dado que los lepisosteidos tienen una tasa de crecimiento muy elevada durante su desarrollo larval, la adición de hormonas tiroideas no influye sobre el crecimiento. Igualmente, existe la posibilidad de que este efecto se presente más tarde en el desarrollo. Sin embargo, algo notable en el caso de ambas especies fue el crecimiento más acelerado del hocico, asociado con el suministro de hormonas tiroideas, lo que refleja un efecto sobre el crecimiento óseo.

Las tasas de crecimiento del catán y del pejelagarto pinto observadas durante el cultivo, coinciden con las reportadas en la literatura (Mendoza *et al.*, 2008a). Al evaluar la tasa de crecimiento durante cada punto de muestreo (cada dos o tres días, para el catán o pejelagarto pinto respectivamente), en ambas especies se observa una dramática disminución de la velocidad de crecimiento una vez que se terminan las reservas vitelinas. Esta disminución del crecimiento también se ha reportado en otras especies de lepisosteidos. Comabella *et al.* (2010) reportaron este patrón en el manjuarí (*Atractosteus tristoechus*), señalando que durante esta etapa del desarrollo, la larva inicia su alimentación exógena, por lo que cuenta con una menor cantidad de nutrientes hasta que es capaz de adaptarse a este tipo de alimentación. Además señalan que durante este periodo de transición se presentan cambios morfológicos muy drásticos en las larvas, por

lo que mucha de la energía es utilizada en la metamorfosis y por lo tanto el crecimiento disminuye.

Brown y Kim (1995), observaron un crecimiento más homogéneo en talla de las larvas de perca (*Polydactylus sexfilis*) después de administrar la hormona T₃. Si este efecto se presentará en los lepisosteidos, será una ventaja para el cultivo, ya que el principal problema del cultivo comercial de estas especies es el canibalismo asociado con la diferencia de tallas durante la etapa larval. Un crecimiento más uniforme podría reducir de manera significativa este problema. Al observar la desviación de los datos de longitud total del catán a los 10 DDE, se puede apreciar que las larvas del tratamiento T₃ crecieron de manera más homogénea que las del control. Sin embargo, en el pejelagarto pinto no se aprecia este efecto, aunque hay que tomar en cuenta que las larvas utilizadas en este bioensayo no provenían de un desove único, lo que pudo propiciar un incremento en la variación del crecimiento. Es necesario realizar más estudios enfocados específicamente en este problema.

Efecto en el desarrollo del hocico

Como una manera de evaluar el efecto de las hormonas tiroideas sobre la metamorfosis de las larvas de catán y pejelagarto pinto, se obtuvo la relación de la longitud del hocico y la longitud total de la larva para cuantificar el grado de desarrollo del hocico durante el crecimiento. En el catán se encontró un incremento significativo de esta relación a los 6 y 8 DDE en las larvas del tratamiento T₃, además de que a los 10 DDE los valores parecen llegar a un *plateau*, lo que sugiere que la boca está terminando de desarrollarse en este momento, mientras que en el tratamiento control aún se mantiene en crecimiento. Este resultado indica que esta hormona aceleró de manera significativa el crecimiento del hocico y por lo tanto influye en el desarrollo y la metamorfosis del catán.

En el caso del pejelagarto pinto, si bien no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, el desarrollo del hocico fue mayor en los tratamientos con hormonas tiroideas. Mendoza *et al.* (2008a) señalan que, a

diferencia del catán, el desarrollo de las demás especies de lepisosteidos es un poco más lento, por lo que tal vez hicieron falta más días de cultivo para apreciar un efecto significativo de las hormonas sobre el desarrollo del hocico.

El crecimiento inminente del hocico, aún en larvas de catán en inanición a expensas de otros tejidos, revelan que este proceso es una prioridad durante el desarrollo temprano de los lepisosteidos (Mendoza *et al.*, 2003). El efecto benéfico de las hormonas tiroideas en este caso se traduciría en la posibilidad de adquirir y procesar alimentos más complejos, debido al efecto sinérgico del aumento en la actividad enzimática, desde etapas de desarrollo primarias, lo que les conferiría un mayor crecimiento y una mayor cantidad de reservas, asegurando la supervivencia de las larvas.

En este mismo sentido, Mendoza *et al.* (2003) y Aguilera *et al.* (2010) evaluaron los efectos de un agente anti-tiroideo (tiourea) en el desarrollo de las larvas de catán. Estos autores observaron que el nivel de desarrollo del hocico disminuyó mientras que el crecimiento de la larva se mantuvo. Esto dio como resultado larvas más grandes con una boca más pequeña, lo que disminuía de manera significativa el canibalismo en los cultivos. Con base en estos resultados, queda claro que es muy importante en un futuro ampliar los estudios utilizando agentes anti-tiroideos en los lepisosteidos.

Efecto en la supervivencia

Es un hecho que las hormonas tiroideas incrementan la supervivencia de las larvas de distintas especies de peces (Tabla I). Este efecto positivo sobre la supervivencia puede ser multifactorial. Debido a que las hormonas tiroideas promueven la diferenciación del sistema nervioso central, pueden originar un gran número de beneficios a corto y largo plazo en las larvas, ya que pueden adquirir de manera precoz la capacidad para localizar su alimento, escapar de los depredadores, etc. Además, el efecto de estas hormonas en otros procesos de desarrollo de la larva, puede proporcionar una mayor flexibilidad ambiental y alimenticia, por ejemplo se sabe que promueven el inflamamiento de la vejiga

natatoria, lo que mejora el desplazamiento de las larvas para obtener más fácilmente su alimento (Brown *et al.*, 1989).

En este estudio, la supervivencia de las larvas de catán en el tratamiento con T₃ fue mayor que en el control, aunque no se presentaron diferencias significativas, posiblemente debido al bajo número de repeticiones que se obtuvo en este bioensayo. Es importante que en un futuro se estudie este aspecto con mayor profundidad, dado que, como se mencionó anteriormente, si las hormonas tiroideas promueven una talla más homogénea, se podría esperar una menor mortalidad por canibalismo. Sin embargo, otro punto a considerar es que si las hormonas aceleran el desarrollo del hocico, esto podría inducir un incremento del canibalismo, si no se proporciona alimento en cantidad suficiente y acorde al crecimiento del hocico, como ha sido previamente reportado (Mendoza *et al.*, 2002). No obstante, con base en los resultados de este bioensayo, más que disminuir la tasa de supervivencia, las hormonas tiroideas la incrementan.

La tasa de supervivencia de las larvas de pejelagarto pinto no se pudo evaluar debido a que no se conocía el número inicial de organismos en los tanques experimentales. Sin embargo, se realizó un ensayo independiente en el que se evaluó el índice de supervivencia bajo condiciones de inanición. Mendoza *et al.* (2008b) reportaron que para el catán, las larvas que no se alimentan no sobreviven más de 15 DDE. En este estudio, las larvas de pejelagarto pinto del tratamiento control tuvieron una supervivencia del 100% a los 15 DDE. Esta diferencia seguramente se debe a que el pejelagarto pinto es una especie que se desarrolla más lento que el catán (Mendoza *et al.*, 2008a), además de que las condiciones en las que se evaluó este índice fueron bajo temperatura constante, lo que reduce significativamente el estrés de los organismos (Fry, 1971).

Las larvas de peces logran sobrevivir un determinado número de días en inanición, ya que una vez que se terminan sus reservas energéticas son capaces de catalizar sus tejidos con el fin de obtener energía para continuar con sus procesos metabólicos básicos (Ferron y Leggett, 1994). Sin embargo, el hecho de que las larvas sobrevivan durante tantos días en inanición, como es en el caso de

los lepisosteidos, se debe en parte importante a la gran cantidad de reservas vitelinas con las que cuentan durante los primeros días de su desarrollo. Otras especies como los salmónidos y esturiones, que también cuentan con un saco vitelino grande, también son capaces de sobrevivir un número considerable de días en inanición.

El índice de supervivencia en inanición de las larvas de los tratamientos con hormonas tiroideas, si bien fue alto, fue menor al encontrado en las larvas control. Este resultado, al igual que el consumo más acelerado del saco vitelino, indica un efecto de las hormonas tiroideas sobre el metabolismo de las larvas, ya que el hecho de morir más rápido en condiciones de inanición se debió probablemente a que las reservas fueron consumidas más rápidamente, producto de un metabolismo más acelerado.

VIII.II.II. Actividad de las enzimas digestivas

Una de las estrategias utilizadas para conocer la condición fisiológica y nutricional de las larvas de peces ha sido el cuantificar la producción de las distintas enzimas digestivas (Ferron y Leggett, 1994). Este tipo de estudios han permitido conocer el grado de funcionalidad de los diferentes órganos digestivos a lo largo del período larval. La mayor parte de los reportes coinciden en que las larvas cuentan con un amplio espectro de enzimas digestivas, y que sus niveles de actividad fluctúan durante el período larval en relación con los cambios fisiológicos o alimenticios (Zambonino y Cahu, 2001).

La actividad total de las enzimas digestivas del catán encontrada en este estudio concuerda con la descrita previamente por Mendoza *et al.* (2002). La actividad de la tripsina, proteasas alcalinas totales y leucina-aminopeptidasa inició de manera muy baja a los 2 DDE para después incrementarse a los 4 DDE. La actividad proteolítica ácida se presentó desde el inicio de la alimentación exógena (4 DDE). Por otra parte, aunque la ontogenia de las enzimas digestivas en el pejelagarto pinto no había sido estudiada, siguió un patrón de desarrollo muy similar al de las larvas de catán. En este caso la actividad total de la tripsina,

proteasas alcalinas totales y leucina-aminopeptidasa inició a los 3 DDE, para incrementarse a los 6 DDE, coincidiendo con el consumo de las reservas vitelinas y el cambio en la tasa de crecimiento. La actividad proteolítica ácida inició a los 6 DDE lo que, al igual que en el caso del catán, coincide con el momento en que inicia la alimentación exógena. En otras especies de pejelagarto, como en el caso de *Atractosteus tropicus*, también se observa este patrón de ontogenia enzimática (Márquez *et al.*, 2006; Aguilera *et al.*, 2011).

El hecho de que se presente un incremento repentino en la actividad de las proteasas alcalinas y ácidas en las larvas de catán a los 4 DDE, se debe sin duda a que al momento en que se terminan las reservas vitelinas e inicia la alimentación exógena, el sistema digestivo de las larvas se encuentra muy desarrollado (Aguilera *et al.*, 2010), por lo que ya cuentan con la capacidad de sintetizar y secretar una gran cantidad de enzimas. En el pejelagarto pinto, si bien el incremento no fue tan drástico como en el catán, también se presentó un aumento importante de la actividad de las enzimas evaluadas a los 6 y 9 DDE.

Los peces que no cuentan con grandes reservas vitelinas tienen un sistema digestivo incipiente al momento en que inicia la alimentación exógena. Por ejemplo, a diferencia de las larvas de lepisosteidos, otras especies de peces no son capaces de ingerir una dieta artificial desde el momento en que inician su alimentación exógena (Lazo *et al.*, 2011).

Efecto de las hormonas tiroideas en la actividad enzimática digestiva

Se ha descrito la participación de las hormonas tiroideas en eventos del desarrollo del tracto digestivo en las larvas de peces (Tabla I), ya que actúan sobre la metamorfosis, el desarrollo y la diferenciación de tejidos en las larvas. Por lo tanto, la evaluación de la actividad de las enzimas digestivas permitió conocer de manera indirecta el efecto de estas hormonas sobre el grado de desarrollo de las estructuras digestivas del catán y el pejelagarto pinto. Kuzmina *et al.* (2010) reportaron un aumento de la actividad de estas enzimas en juveniles del rutilo (*Rutilus rutilus*) al administrar T₃. El hecho de que en organismos juveniles, en los

cuales las estructuras digestivas ya se encuentran completamente diferenciadas, también se incrementa la actividad de las enzimas digestivas, sugiere que las hormonas tiroideas además de promover la diferenciación de los tejidos y la organogénesis, también incrementan de manera general la síntesis proteica en tejidos específicos.

- **Actividad tipo tripsina y proteasas alcalinas totales**

La tripsina y las proteasas alcalinas totales son enzimas digestivas secretadas en el páncreas, que actúan en el intestino en condiciones de pH básico y son responsables de la digestión luminal de macromoléculas proteicas en el intestino (Segner *et al.*, 1993). Generalmente, la actividad de este tipo de enzimas inicia muy temprano en el desarrollo, desde antes de la apertura de la boca y el inicio de la alimentación exógena. Esto se debe a que las larvas de peces, antes de la aparición del estómago, ya cuentan con un intestino funcional (Dabrowski y Culver, 1991; Moyano *et al.*, 1996). Algunas de estas enzimas (e.g. fosfatasa alcalina) están implicadas en la digestión de péptidos y proteínas contenidas en el vitelo.

La actividad total tipo tripsina y la actividad de las proteasas alcalinas totales fueron mayores a los 4 y 6 DDE en las larvas de catán del tratamiento con la hormona T₃. En el pejelagarto pinto las hormonas tiroideas también provocaron un incremento significativo de la actividad total tipo tripsina a los 3 y 6 DDE, y en la actividad total de las proteasas alcalinas totales a los 6 y 9 DDE. Estos resultados indican que la administración temprana de las hormonas tiroideas aceleró el desarrollo de las glándulas digestivas en el páncreas de las larvas de ambas especies, incrementando así la síntesis de estas enzimas digestivas.

La similitud inicial del patrón de actividad total tipo tripsina y proteasas alcalinas totales en ambas especies indica que la tripsina tiene gran importancia cuantitativa entre las proteasas alcalinas durante el inicio del desarrollo. Sin embargo, en el caso del catán, conforme el desarrollo de las larvas continuó, la actividad de las proteasas alcalinas se mantuvo consistente, mientras que la

actividad tipo tripsina disminuyó, lo que sugiere la aparición de otras enzimas alcalinas distintas conforme la larva se desarrolla (e.g. quimotripsina).

- **Actividad de proteasas ácidas totales**

La actividad proteolítica ácida se localiza principalmente en el estómago e inicia gracias a la activación de zimógenos tipo pepsinógeno producidos por las glándulas gástricas. Las larvas de catán se caracterizan por poseer un estómago funcional e iniciar la secreción de proteasas ácidas a partir del inicio de la alimentación exógena, lo que indica la maduración precoz del tracto digestivo en esta especie (Mendoza *et al.*, 2002). Esta característica parece ser exclusiva de especies con larvas que cuentan con grandes reservas vitelinas, ya que al igual que en los lepisosteidos, los salmónidos y los esturiones también presentan una maduración precoz del estómago (Gawlicka *et al.*, 1995).

Al parecer, la administración de T_3 a los huevos de catán influye en el desarrollo del estómago y en la síntesis de proteasas ácidas en las glándulas gástricas, ya que a los 4 DDE la actividad total de las proteasas ácidas de las larvas de catán del tratamiento T_3 fue significativamente mayor que en el control. En el caso del pejelagarto pinto, no se observó un incremento tan notable en la actividad de las proteasas ácidas de las larvas de los tratamientos con hormonas tiroideas. Esto posiblemente se deba a que en esta especie se realizó una transferencia materna. Es posible que la concentración inicial de hormonas tiroideas administrada fuese menor que en el catán, y que no haya sido suficiente para promover la síntesis de este tipo de enzimas, debido a que hacen su aparición al final del desarrollo del tracto digestivo. Igualmente debe considerarse el hecho de que esta especie presenta un desarrollo más lento, por lo que es de esperarse que la actividad ácida se manifieste después, como ha sido demostrado en otras especies de lepisosteidos (Mendoza *et al.*, 2008).

- **Actividad tipo leucina-aminopeptidasa**

Las células epiteliales del intestino en los peces (enterocitos principalmente) poseen enzimas intra y extra celulares: las enzimas del citosol y las enzimas del borde en cepillo, respectivamente. Las enzimas del citosol se encuentran en el citoplasma celular y son principalmente hidrolasas ácidas. Por su parte, las enzimas del borde en cepillo están asociadas a la membrana celular y entre ellas se encuentra la leucina-aminopeptidasa (LAP). Esta enzima se considera un buen indicador del grado de madurez del intestino y del estado nutricional de las larvas, por lo que el incremento en su actividad de acuerdo a la edad de las larvas, indica un adecuado desarrollo y maduración del intestino (Cahu y Zambonino, 1997).

En ambas especies se encontró un incremento gradual de la actividad total tipo leucina-aminopeptidasa en relación directa con el desarrollo de las larvas. Además, en el catán se encontró un incremento significativo de esta actividad a los 4 y 6 DDE en las larvas del tratamiento T₃. De igual forma, en el pejelagarto pinto se encontró un incremento significativo de la actividad a los 3 y 9 DDE en las larvas de los tratamientos T₃ y T₄. Al igual que en las otras enzimas, las hormonas tiroideas incrementaron la actividad tipo leucina-aminopeptidasa en ambas especies, lo que es una prueba más del efecto de estas hormonas en el desarrollo y madurez del intestino en las larvas de lepisosteidos.

Efectos en la actividad específica (U/mgP)

Al contrario de lo observado en la actividad enzimática total (U/larva), en la actividad específica (U/mgP) no se registró un efecto significativo de las hormonas tiroideas. Esto probablemente se debe a que estas hormonas promueven la síntesis proteica total, por lo que al incrementar la síntesis de enzimas digestivas también se incrementa la síntesis de proteínas estructurales, y por lo tanto no se apreció un aumento de la actividad enzimática en relación a la concentración de proteína total en los extractos.

En el pejelagarto pinto se presentó una actividad enzimática específica alta al inicio del desarrollo para después disminuir y mantenerse. El hecho de que no se haya incrementando la actividad específica en las larvas probablemente se deba que durante la etapa de desarrollo también se incrementó el tamaño del estómago y del intestino. Por consecuencia, aumentó el contenido de proteínas estructurales en los extractos enzimáticos, y por lo tanto no se incrementó el aporte relativo de las enzimas evaluadas.

En el catán ocurrió lo contrario, ya que la actividad específica siguió el mismo patrón de desarrollo que la actividad total. Al parecer la síntesis de enzimas digestivas en el catán aumenta a la misma velocidad en que aumenta la síntesis de proteínas estructurales. Tal vez esto ocurra debido a que el catán tiene una tasa de crecimiento más elevada que la del pejelagarto pinto, y por lo tanto requiere consumir mucho alimento y digerirlo muy rápidamente.

VIII.II.III. Relación de ácidos nucleicos

La relación RNA:DNA ha probado ser un valioso indicador bioquímico de la condición fisiológica y nutricional de las larvas de peces durante su desarrollo (Wright y Martin, 1985; Clemmesen, 1987; Raae *et al.*, 1988; Westerman y Holt, 1994; Deane *et al.*, 2003; Tardif *et al.*, 2005; Hook *et al.*, 2008). El principio teórico de esta relación supone que el contenido de DNA es virtualmente constante en los tejidos somáticos, de tal manera que las concentraciones tisulares de DNA reflejan solo el número de células y es independiente de la condición del organismo. Por otro lado, la cantidad de RNA celular, principalmente el RNA ribosomal (RNAr) disponible en los tejidos, es directamente proporcional al nivel de síntesis de proteínas. Un incremento en la relación RNA:DNA indica un aumento en la transcripción de RNA mensajero (RNAm) que después es traducido a proteínas metabólicas y estructurales en los ribosomas (Buckley, 1984; Canino y Caldarone, 1995; Buckley *et al.*, 1999).

En el catan la relación RNA:DNA se mantuvo relativamente consistente durante todo el desarrollo de las larvas, sin detectarse un incremento significativo

provocado por la hormona T_3 . No obstante, en el tratamiento control no se observaron variaciones al inicio del desarrollo larval, lo que significaría una síntesis sostenida de proteínas. Esto es consistente con la relación de los ácidos nucleicos con respecto al peso seco de las muestras analizadas, ya que se apreció un aumento significativo en la relación DNA:Peso Seco y RNA:Peso Seco a los 0 DDE en las larvas del tratamiento T_3 . El incremento de estas relaciones es un indicador del efecto de esta hormona tanto en el metabolismo (requerimiento proteico) como en el crecimiento (proliferación celular) de las larvas de catán recién eclosionadas.

Debido a que la hormona T_3 provocó un incremento similar tanto del DNA (proliferación celular) como del RNA (mayor metabolismo), la relación RNA:DNA no resultó el mejor indicador del efecto de las hormonas tiroideas en el desarrollo de las larvas de catán, ya que si bien se encontró mayor concentración de ácidos nucleicos en las larvas del tratamiento T_3 al momento de la eclosión, la relación entre ambos fue muy similar a la del tratamiento control.

Al analizar la relación RNA:DNA en larvas de catán, Mendoza *et al.* (2008) y Aguilera *et al.* (2010) encontraron que este índice fue aumentando hasta los 9 DDE, para después mantenerse consistente. En el presente estudio la relación RNA:DNA se mantuvo constante desde el inicio del desarrollo de las larvas. Esta discrepancia probablemente se deba a que este índice bioquímico puede verse afectado por diversos factores como la temperatura de cultivo, el tejido utilizado para extraer los ácidos nucleicos y principalmente la técnica de cuantificación empleada, así como la elección de los estándares de ácidos nucleicos (Buckley *et al.*, 1999; Satterwhite, 2003). Debido a lo anterior, es importante que se tomen en cuenta todos estos posibles factores de variación antes de utilizar esta relación de manera comparativa entre distintas especies, así como entre distintos estudios con la misma especie.

A diferencia de las técnicas utilizadas por Aguilera *et al.* (2010), en el presente estudio se utilizó una técnica de cuantificación fluorimétrica en microplaca de nueva generación (Kaplan *et al.*, 2001). Con el reciente desarrollo

de lectores de fluorescencia en microplaca, así como de fluoróforos específicos que se intercalan en el DNA de doble cadena, se ha hecho posible incrementar más de 100 veces la sensibilidad en los ensayos de RNA:DNA. Al comparar esta nueva metodología con técnicas utilizadas anteriormente en larvas de peces, se encontraron valores en la relación RNA:DNA menores y con menor desviación estándar (Kaplan *et al.*, 2001).

A diferencia de lo encontrado en el catán, la relación RNA:DNA del pejelagarto pinto a los 0 DDE fue significativamente menor en el tratamiento control con respecto a los tratamientos con hormonas tiroideas. En esta especie, este índice de condición si reflejó un efecto de las hormonas tiroideas en el metabolismo. Esto posiblemente se presentó debido a que la tasa de crecimiento del pejelagarto pinto es menor a la del catán, por lo tanto la proliferación celular, que se refleja en la concentración de DNA, es menor. De esta forma, la cantidad de RNA sintetizada al aplicar hormonas tiroideas fue mayor a la cantidad de DNA total y por lo tanto la relación aumentó.

Relación RNA:DNA en Otras Especies de Peces

Los valores de la relación RNA:DNA obtenidos en este estudio para ambas especies de lepisosteidos coincidieron con los resultados normalmente reportados en la literatura para distintas especies de peces, valores que varían entre 0.5 y 5.0 dependiendo del estudio (Kaplan *et al.*, 2001). Sin embargo, a diferencia de lo que normalmente se ha observado, la relación de ácidos nucleicos encontrada en el catán y el pejelagarto pinto se mantuvo consistente durante todo el desarrollo temprano.

En larvas de peces marinos se reporta una disminución de la relación RNA:DNA conforme se consume el saco vitelino. Sin embargo, a partir del inicio de la alimentación exógena, esta relación se correlaciona con el crecimiento de las larvas, aumentando a la vez que aumenta el tamaño de los organismos. No obstante, una vez que se alcanza la etapa juvenil, los valores se mantienen

consistentes durante el resto del desarrollo (Westerman y Holt, 1994; Deane *et al.*, 2003).

La disminución inicial de la relación RNA:DNA reportada en larvas de peces marinos conforme se consume el saco vitelino, solo se apreció en el grupo control (Figura 36 y 39), aunque estos resultados se deben analizar con precaución ya que no se analizaron larvas completas, sino que solo se analizaron muestras de músculo, específicamente del pedúnculo caudal. Por lo tanto, la alta concentración de RNA que se encuentra en el saco vitelino no fue cuantificada, y por consiguiente no se apreció un incremento de esta relación en las larvas recién eclosionadas de catán y pejelagarto pinto.

Por otra parte, el hecho de que esta relación se halla mantenido consistente durante el crecimiento de las larvas puede deberse a varios factores, entre ellos la dinámica del crecimiento celular. Un organismo puede alcanzar su crecimiento al incrementar el número de células (hiperplasia) o al incrementar el tamaño de sus células (hipertrofia) (Buckley *et al.*, 1999; Satterwhite, 2003). Al parecer en los lepisosteidos la hiperplasia es mayor que en otras especies de peces, ya que una mayor cantidad de DNA es el resultado de un mayor número de células en los tejidos.

Existen dos alternativas para la producción de RNA (síntesis de proteínas) en los organismos: al producir un mayor número de ribosomas en las células, o al incrementar la actividad ribosomal sin necesidad de producir un mayor número de ribosomas. El hecho de que la relación RNA:DNA no haya aumentado en el catán y pejelagarto pinto puede deberse a que, en lugar de producir un mayor número de ribosomas, se incrementa la eficiencia y actividad ribosomal, lo que en cantidades netas reduce la concentración de RNA total (Buckley *et al.*, 1999).

Finalmente, también se ha reportado que en organismos juveniles la relación RNA:DNA se mantiene constante, ya que al incrementarse la masa de los organismos, el RNA sintetizado solo se utiliza para la síntesis de enzimas y proteínas estructurales degradadas, por lo tanto, se requiere de una menor cantidad de RNA total (Buckley *et al.*, 1999). Es posible que a pesar de no ser

juveniles, las larvas de lepisosteidos presentan un efecto como este, ya que al contar con un crecimiento tan acelerado, alcanzan la metamorfosis y la etapa juvenil más rápido que en otros peces.

IX. Conclusiones

- La administración de las hormonas tiroideas por vía directa a los huevos o por transferencia materna, provocaron un incremento significativo en la concentración de T_3 y T_4 en los huevos de catán y pejelagarto pinto.
- Al administrar de manera directa la hormona T_3 a los huevos, se presentó una mayor transferencia, en comparación con el método de inyección materna. Esto debido a la capacidad de esta molécula de atravesar la cubierta del huevo.
- Al igual que en otras especies de peces, el pejelagarto pinto cuenta con un mecanismo de transferencia materna de las hormonas tiroideas hacia el ovocito. Se puede inferir que es un proceso ligado a la vitelogénesis y la fase final de maduración del huevo, ya que la concentración de hormonas tiroideas en los ovocitos inmaduros fue significativamente menor a la de los huevos fertilizados.
- Los embriones de catán y pejelagarto pinto cuentan con un mecanismo funcional de conversión de T_4 a T_3 , ya que al incrementar los niveles de T_3 se presentó una regulación negativa que incrementó a su vez la concentración de T_4 por encima de la concentración del tratamiento control.
- El excedente de hormonas tiroideas proporcionado a las larvas fue consumido casi en su totalidad al momento de la eclosión, probablemente debido a la alta tasa metabólica que presentan estas especies.
- El incremento de la concentración de T_4 pocos días después de la eclosión, indica el desarrollo de una glándula tiroidea funcional desde etapas muy tempranas en el desarrollo de los lepisosteidos.
- Las hormonas tiroideas promueven la reproducción del pejelagarto pinto, ya que al inyectarlas a hembras reproductoras se incrementó el número de desoves.

- Las hormonas tiroideas incrementaron la tasa de eclosión de las larvas de pejelagarto pinto más no la de las larvas de catán. Aplicar las hormonas por vía materna mejora la tasa de eclosión al promover beneficios en el embrión desde el momento de la fertilización.
- La administración de hormonas tiroideas aceleró el metabolismo y la utilización de las reservas vitelinas en las larvas de ambas especies, ya que se presentó una disminución en el tamaño del saco vitelino, lo que a su vez se correlacionó con el peso seco de las larvas al momento de la eclosión.
- Las hormonas tiroideas aceleraron el desarrollo del hocico de las larvas de ambas especies. Esto es un indicador del efecto de estas hormonas en el desarrollo y la metamorfosis del catán y el pejelagarto pinto y confirman la prioridad en la morfogénesis de esta estructura.
- La tasa de supervivencia de las larvas de catán del tratamiento T_3 fue mayor a la del control, sin embargo no se encontraron diferencias significativas.
- El índice de supervivencia en inanición de las larvas de pejelagarto pinto provenientes de hembras inyectadas con hormonas tiroideas disminuyó, probablemente a causa de un consumo más acelerado de sus reservas energéticas.
- La ontogenia de la actividad enzimática digestiva del pejelagarto pinto sigue un patrón de desarrollo muy similar al de las larvas de otras especies de lepisosteidos. La actividad total de la tripsina, proteasas alcalinas totales y leucina-aminopeptidasa inició a los 3 DDE. La actividad proteolítica ácida inició a los 6 DDE, lo que coincide con el momento en que inicia la alimentación exógena.
- La actividad de las proteasas alcalinas totales, proteasas ácidas totales, tripsina y leucina-aminopeptidasa en las larvas de catán expuestas a la hormona T_3 fue significativamente mayor a los 4 y 6 DDE, lo que indica que esta hormona acelera el desarrollo del tracto digestivo en el catán.

- Las larvas de pejelagarto pinto expuestas a los tratamientos con hormonas tiroideas presentaron un incremento significativo de la actividad de las proteasas alcalinas totales y de la tripsina a los 9 y 6 DDE, respectivamente. Asimismo, la actividad tipo leucina-aminopeptidasa fue mayor a los 3 y 9 DDE, en los tratamientos T_3 y T_4 . Estos resultados indican que las hormonas tiroideas aceleran el desarrollo del tracto digestivo en larvas de pejelagarto pinto.
- En las larvas de catán del tratamiento T_3 se apreció un aumento significativo en la relación DNA:Peso Seco y RNA:Peso Seco a los 0 DDE. El incremento de estas relaciones es un indicador del efecto de esta hormona tanto en el metabolismo (requerimiento proteico) como en el crecimiento (proliferación celular) de las larvas recién eclosionadas.
- Debido a que la hormona T_3 provocó un incrementó similar tanto del DNA (proliferación celular) como del RNA (mayor metabolismo) al momento de la eclosión, la relación RNA:DNA no funcionó como un indicador del efecto de las hormonas tiroideas en el desarrollo de las larvas de catán.
- La relación RNA:DNA del pejelagarto pinto a los 0 DDE fue significativamente menor en el tratamiento control con respecto a los tratamientos con hormonas tiroideas. En esta especie, este índice de condición si reflejó un efecto de las hormonas tiroideas en el metabolismo.

X. Literatura Citada

- Aguilera, C. (1999) Bases fisiológicas del desarrollo de larvas de catán (*Atractosteus spatula*) y perspectivas para su cultivo. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Monterrey, NL, 186 p.
- Aguilera, C., R. Mendoza, G. Rodríguez y G. Márquez (2002) Morphological Description of Alligator Gar and Tropical Gar Larvae, with an Emphasis on Growth Indicators. *Transactions of the American Fisheries Society*, 131: 899-909.
- Aguilera, C., R. Mendoza, J. Montemayor, A. Revol, L. Carreón y J. Holt (2010) En: Mendoza, R., C. Aguilera y Montemayor, J. (Eds.) Biología, Ecología y Avances en el Cultivo del Catán *Atractosteus spatula*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, México. 234 p.
- Aguilera, C., R. Mendoza, I. Iracheta y G. Marquez (2011) Digestive enzymatic activity on Tropical gar (*Atractosteus tropicus*) larvae fed different diets. *Fish Physiol. Biochem.*, 1-13.
- Appel, W. (1974) Leucine aminopeptidase determination with L-leucineamide as substrate. En: Bergmeyer, H. (Ed.) *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press. Nueva York, EUA. pp: 954-958.
- Ayson, F. y T. Lam (1993) Thyroxine injection of female rabbitfish (*Siganus guttatus*) broodstock: changes in thyroid hormone levels in plasma, eggs, and yolk-sac larvae, and its effect on larval growth and survival. *Aquaculture*, 109: 83-93.
- Babin, P. (1992) Binding of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine to trout plasma lipoproteins. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism.*, 262: 712-720.
- Bjornsson, B., O. Halldorsson, C. Haux, B. Norberg y C. Brown (1997) Photoperiod control of sexual maturation of the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): plasma thyroid hormone and calcium levels. *Aquaculture*, 166: 117-140.

- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254.
- Brinkman, E. (2003) Contributions to the Life History of Alligator Gar, *Atractosteus spatula* (Lacépède), in Oklahoma. Master Degree dissertation. Arkansas Tech University, United States – Arkansas. 37 p.
- Brooks, S., C. Tyler y J. Sumpter (1997) Egg quality in fish: what makes a good egg?. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 7: 387-416.
- Brown, C., S. Doroshov, M. Cochran y H. Bern (1989) Enhanced survival in striped bass fingerlings after maternal triiodothyronine treatment. *Fish Physiology and Biochemistry*, 7: 295-299.
- Brown, C. y B. Kim (1995) Combined application of cortisol and triiodothyronine in the culture of larval marine finfish. *Aquaculture*, 135: 79-86.
- Buckley, L. (1984) RNA-DNA ratio: and index of larval fish growth in the sea. *Marine Biology*, 80: 291-298,
- Buckley, L., E. Caldarone y T. Ong (1999) RNA-DNA ratio and other nucleic acid-base indicators for growth and condition of marine fishes. *Hydrobiologia*, 401: 265-277.
- Burr, B. y L. Page (2011) Peterson Field Guide to Freshwater Fishes, Second Edition. Houghton Mifflin Harcourt, EUA. 688 p.
- Cahu, C. y J. Zambonino (1997) Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for compound diet feeding? *Aquaculture International*, 5: 151-160.
- Canino, M. y E. Caldarone (1995) Modification and comparison of two fluorometric techniques for determining nucleic acid contents of fish larvae. *Fishery Bulletin*, 93(1): 158-165.
- Carlander, K. (1969) Handbook of Freshwater Fishery Biology, Volume One. The Iowa State University Press, Iowa, EUA. 752 p.
- Clemmesen, C. (1987) Laboratory studies on RNA/DNA ratios of starved and fed herring (*Clupea harengua*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. *Journal du Conseil International Pour l'Exploration de la Mer*, 43: 122-128.

- Comabella, Y., A. Hurtado y T. García (2010) Ontogenetic Changes in the Morphology and Morphometry of Cuban Gar (*Atractosteus tristoechus*). *Zoological Science*, 27: 931-938.
- Conceicao, L., C. Aragao, N. Richard, S. Engrola, P. Gavaia, S. Mira y J. Dias (2009) Novel methodologies in marine fish larval nutrition. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36: 1-16.
- Contreras, S. y G. Ruiz (2010) Sistemática y Distribución de Catanes, Pejelagartos y Agujas (Familia Lepisosteidae) en México. En: Mendoza, R., C. Aguilera y Montemayor, J. (Eds.) *Biología, Ecología y Avances en el Cultivo del Catán Atractosteus spatula*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, México. 234 p.
- Cyr, D. y J. Eales (1996) Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 6: 165-200.
- Dabrowski, K. y D. Culver (1991) The physiology of larval fish, digestive tract and formulation of starter diets. *Aquacult. Mag.*, 17: 49-61.
- Deane, E., S. Kelly, P. Collins y N. Woo (2003) Larval Development of Silver Sea Bream (*Sparus sarba*): Ontogeny of RNA-DNA Ratio, GH, IGF-I, and $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$. *Marine Biotechnology*, 5: 79-91.
- Eales, J. y S. Brown (1993) Measurement and regulation of thyroidal status in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 3: 299-347.
- Erlanger, B., N. Kokowsky y W. Cohen (1961) The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95(2): 271-278.
- Evered, D., P. Vice, E. Green y D. Appleton (1976) Assessment of thyroid hormone assays. *Journal of Clinical Pathology*, 29(12): 1054-1059.
- Farbridge, K. y J. Leatherland (1992) Temporal changes in plasma thyroid hormone, growth hormone and free fatty acid concentrations, and hepatic 5'-monodeiodinase activity, lipid and protein content during chronic fasting and re-feeding in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 10(3): 245-257.

- Ferrara, A. (2001) Life-history strategy of Lepisosteidae: Implications for the conservation and management of alligator gar. Ph.D. dissertation, Auburn University, United States – Alabama. 126 p.
- Ferron, A. y W. Leggett (1994) An appraisal of condition measures for marine fish larvae. *Advances in Marine Biology*, 30: 217-303.
- Finnson, K., J. McLeese y J. Eales (1999) Deiodination and deconjugation of thyroid hormone conjugates and type I deiodination in liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, 115: 387-397.
- Fry, F. (1971) The Effect of Environmental Factors on the Physiology of Fish. En: Hoar, W. y D. Randall (Ed.) *Fish Physiology*. Academic Press. Nueva York, EUA. pp: 1-87.
- Gawlicka, A., S. Teh, S. Hung, D. Hinton y J. de la Noue (1995) Histological and histochemical changes in the digestive tract of white sturgeon larvae during ontogeny. *Fish Physiol. Biochem.*, 14(5): 357-371.
- Goodyear, P. (1967) Feeding Habits of Three Species of Gars, *Lepisosteus*, Along the Mississippi Gulf Coast. *Transactions of the American Fisheries Society*, 96: 297-300.
- Govoni, J., G. Boehlert e Y. Watanabe (1986) The physiology of digestion in fish larvae. *Environmental Biology of Fishes*, 16(1-3): 59-77.
- Greenblatt, M., C. Brown, M. Lee, S. Dauder y H. Bern (1989) Changes in thyroid hormone levels in eggs and larvae and in iodide uptake by eggs of coho and chinook salmon, *Oncorhynchus kisutch* and *O. tshawytscha*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 6(5): 261-278.
- Hook, T., E. Gorokhova y S. Hansson (2008) RNA:DNA ratios of Baltic Sea herring larvae and copepods in embayment and open sea habitats. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 76: 29-35.
- Huang, L., J. Specker y A. Bengtson (1996) Effect of triiodothyronine on the growth and survival of larval striped bass (*Morone saxatilis*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 15: 57-64.

- Inui, Y. y S. Miwa (1985) Thyroid hormone induces metamorphosis of flounder larvae. *General and Comparative Endocrinology*, 60: 450-454.
- Inui, Y., M. Tagawa, S. Miwa y T. Hirano (1989) Effects of bovine TSH on the tissue thyroxine level and metamorphosis in prometamorphic flounder larvae. *General and Comparative Endocrinology*, 74: 406-410.
- Kaplan, L., J. Leamon y J. Crivello (2001) The Development of a Rapid and Sensitive, High-Through-Put Protocol for RNA:DNA Ratio Analysis. *Journal of Aquatic Animal Health*, 13: 276-279.
- Kang, D. e Y. Chang (2004) Effects of maternal injection of 3,5,3'-triodo-L-thyronine (T3) on growth of newborn offspring of rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Aquaculture*, 234(1-4): 641-655.
- Kayaba, T., N. Sasaki, S. Adachi y K. Yamauchi (2008) Effects of Pituitary Glycoprotein Hormones and Thyroid Hormones on In-Vitro Vitellogenin Incorporation into Organ-Cultures Oocytes in the Japanese Eel, *Anguilla japonica*. *Zoological Science*, 25(3): 334-343.
- Kobuke, L., J. Specker y H. Bern (1987) Thyroxine content of eggs and larvae of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Journal of Experimental Zoology*, 242(1): 89-94.
- Kuzmina, V., B. Levin, L. Vei y P. Rusanova (2010) Effect of Thyroid Hormones on Activity Dynamics of Enzymes of Intestinal Mucosa of Juvenile Roach *Rutilus rutilus*. *Journal of Ichthyology*, 50(5): 396-401.
- Lam, T. (1980) Thyroxine enhances larval development and survival in *Sarotherodon* (Tilapia) *mossambicus* Ruppel. *Aquaculture*, 21: 287-291.
- Lam, T. (1994) Hormones and egg/larval quality in fish. *Journal of the World Aquaculture Society*, 25: 2-12.
- Landines, M., A. Sanabria, J. Senhorini y E. Urbinati (2010) The influence of triiodothyronine (T3) on the early development of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 36(4): 1291-1296.
- Lauff, M. y R. Hofer (1984) Proteolytic Enzymes in Fish Development and the Importance of Dietary Enzymes. *Aquaculture*, 37: 335-346.

- Lazo, J., M. Darias y E. Gisbert (2011) Ontogeny of the digestive tract. En: Joan Holt, G. (Ed.) Larval Fish Nutrition. John Wiley & Sons. New Jersey, EUA. pp: 1-46.
- Leatherland, J., L. Lin, N. Down y E. Donaldson (1989a) Thyroid hormone content of eggs and early development stages of five *Oncorhynchus* species. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46: 2140-2145.
- Leatherland, J., L. Lin, N. Down y E. Donaldson (1989b) Thyroid hormone content of eggs and early developmental stages of three stocks of goitred coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) from the great lakes of North America, and a comparison with a stock from British Columbia. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46: 2146-2152.
- Leatherland, J. y S. Barrett (1993) Investigations into the development of the pituitary-gland thyroid-tissue axis and distribution of tissue thyroid-hormone content in embryonic coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) from Lake Ontario. *Fish Physiology and Biochemistry*, 12: 149-159.
- Liu, Y. y W. Chan (2002) Thyroid hormones are important for embryonic to larval transitory phase in Zebrafish. *Differentiation*, 70: 36-45.
- Love, J. (2004) Age, growth and reproduction of spotted gar, *Lepisosteus oculatus* (Lepisosteidae), from the lake Ponchertrain estuary, Louisiana. *Southwestern Naturalist*, 49(1): 18-23.
- MacKenzie, D., J. Warner y P. Thomas (1987) Thyroid-reproductive relationships in the channel catfish *Ictalurus punctatus*: evidence for estradiol-induced changes in plasma thyroid hormone binding. En: Idler, D., L. Crim y K. Walsh (Ed.) Reproductive physiology of fish. Memorial University Press, St. John's, Newfoundland, Canada. 205 p.
- Márquez, G., C. Alvarez, W. Contreras, U. Hernández, A. Hernández, R. Mendoza, C. Aguilera, T. García, R. Civera y E. Goytortua (2006) Avances en la Alimentación y Nutrición del Pejelagarto *Atractosteus tropicus*. Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. UANL, Monterrey, NL, México. 446-523 pp.

- Melzner, F., J. Forsythe, P. Lee, J. Wood, U. Piatkowski y C. Clemmesen (2005) Estimating recent growth in the cuttlefish *Sepia officinalis*: are nucleic acid-based indicators for growth and condition the method of choice?. *Journal of Experimental Biology and Ecology*, 317: 37-51.
- Mendoza, R. y C. Aguilera (2001) Bases Fisiológicas del Desarrollo de Larvas de *Atractosteus spatula* y Perspectivas para su Cultivo. *Ciencia UANL*, 4(2): 161-168.
- Mendoza, R., C. Aguilera, G. Rodríguez, M. González y R. Castro (2002) Morphophysiological studies on alligator gar (*Atractosteus spatula*) larval development as a basis for their culture and repopulation of their natural habitats. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 12: 133-142.
- Mendoza, R. y C. Aguilera (2008) Estrategias de Alimentación para el Cultivo de Larvas de Catán (*Atractosteus spatula*). *Ciencia UANL*, 11(4): 366-376.
- Mendoza, R., C. Aguilera y A. Ferrara (2008a) Gar biology and culture: status and prospects. *Aquaculture Research*, 39(7): 748-763.
- Mendoza, R., C. Aguilera, L. Carreón, J. Montemayor y M. González (2008b) Weaning of alligator gar (*Atractosteus spatula*) larvae to artificial diets. *Aquaculture Nutrition*, 14(3): 223-231.
- Milne, R. y J. Leatherland (1978) Effect of Ovine TSH, Thiourea, Ovine Prolactin and Bovine Growth Hormone on Plasma Thyroxine and Tri-Iodothyronine Levels in Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. *Journal of Comparative Physiology*, 124: 105-110.
- Monteverdi, G. y R. Di Giulio (2000) Vitellogenin Association and Oocytic Accumulation of Thyroxine and 3,5,3'-Triiodothyronine in Gravid *Fundulus heteroclitus*. *General and Comparative Endocrinology*, 120: 198-211.
- Moyano, F., M. Diaz, F. Alarcon y M. Sarasquete (1996) Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.*, 15(2): 121-130.

- Mylonas, C., C. Sullivan y J. Hinshaw (1994) Thyroid hormones in brown trout (*Salmo trutta*) reproduction and early development. *Fish Physiology and Biochemistry*, 13: 485-493.
- Nacario, J. (1983) The effect of thyroxine on the larvae and fry of *Sarotherodon niloticus* L. *Tilapia nilotica*. *Aquaculture*, 34: 73-83.
- Navarrete, P., A. Orozco, C. Valverde, A. Olvera, E. Toledo, L. Ross y C. Martínez (2011) Effects of thyroxine administration on the growth and survival of pike silverside (*Chirostoma estor*) juveniles. *Aquaculture Research*, 42: 808-814.
- Power, D., L. Llewellyn, M. Faustino, M. Nowell, B. Björnsson, I. Einarsdottir, A. Canario y G. Sweeney (2001) Thyroid hormones in growth and development of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 130: 447-459.
- Raae, A., I. Opstad, P. Kvenseth y B. Walther (1988) RNA, DNA and Protein During Early Development in Feeding and Starved Cod (*Gadus morhua* L.) Larvae. *Aquaculture*, 73: 247-259.
- Raine, J. y J. Leatherland (2003) Trafficking of L-triiodothyronine between ovarian fluid and oocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 136(B): 267-274.
- Sarath, G., R. de la Motte y F. Wagner (1989) Protease assay methods. En: Beynon, R. y J. Bond (Ed.) *Proteolytic enzymes: a practical approach*. Oxford University Press. Nueva York, EUA. 259 p.
- Satterwhite, M. (2003) RNA:DNA as an Indicator of Nutritional Condition and Growth in Larval Naked Goby, *Gobiosoma bosc*. Tesis de Maestría en Ciencias, Department of Oceanography and Coastal Sciences, Louisiana State University. Louisiana, EUA. 53 p.
- Schultz, K. (2004) *Ken Schultz's Field Guide to Freshwater Fish*. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey, EUA. 257 p.
- Segner, H., R. Rosch, 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.

- SEMARNAT (2004) Carta Nacional Pesquera. Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca, México. 128 p.
- Simon, T. y E. Tyberghein (1991) Contributions to the early life history of the spotted gar, *Lepisosteus oculatus* Winchell, from the Hatchet Creek, Alabama. *Transactions of the Kentucky Academy of Science*, 52: 124-131.
- Sullivan, C., R. Iwamoto y W. Dickhoff (1987) Thyroid hormones in blood plasma of developing salmon embryos. *General and Comparative Endocrinology*, 65: 337-345.
- Tachihara, K., M. Khalil, A. Ishimatsu y M. Tagawa (1997) Improved Seed Production of Goldstriped Amberjack *Seriola lalandi* under Hatchery Conditions by Injection of Triiodothyronine (T3) to Broodstock Fish. *Journal of World Aquaculture Society*, 28(1): 34-44.
- Tagawa, M. y T. Hirano (1987) Presence of thyroxine in eggs and changes in its content during early development of chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *General and Comparative Endocrinology*, 68: 129-135.
- Tagawa, M. y T. Hirano (1990) Changes in tissue and blood concentrations of thyroid hormones in developing chum salmon. *General and Comparative Endocrinology*, 76, 437-443.
- Tagawa, M., T. Ogasawara, T. Sakamoto, T. Miura, K. Yamauchi y T. Hirano (1994) Thyroid hormone concentrations in the gonads of wild chum salmon during maturation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 13: 233-240.
- Tagawa, M., E. de Jesus y T. Hirano (1995) The thyroid hormone monodeiodinase system during flounder metamorphosis. *Aquaculture*, 135: 127-129.
- Tanaka, M., J. Tanangonan, M. Tagawa, E. Dejesus, H. Nishida, M. Isaka, R. Kimura y T. Hirano (1995) Development of the pituitary, thyroid and interrenal glands and applications of endocrinology to the improved rearing of marine fish larvae. *Aquaculture*, 135: 111-126.
- Tardif, D., H. Glémet, P. Brodeur y M. Mingelbier (2005) RNA/DNA ratio and total length of yellow perch (*Perca flavescens*) in managed and natural wetlands

- of a large fluvial lake. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 62: 2211-2218.
- Walpita, C., S. Geyten, E. Rurangwa y V. Darras (2007) The effect of 3,5,3'-triiodothyronine supplementation on zebrafish (*Danio rerio*) embryonic development and expression of iodothyronine deiodinases and thyroid hormone receptors. *General and Comparative Endocrinology*, 152(2-3): 206-214.
- Weber, G., D. Okimoto, N. Richman y E. Grau (1992) Patterns of thyroxine and triiodothyronine in serum and follicle-bound oocytes of the tilapia, *Oreochromis mossambicus*, during oogenesis. *General and Comparative Endocrinology*, 85: 392-404.
- Westerman, M. y G. Holt (1994) RNA:DNA ratio during the critical period and early larval growth of the red drum *Sciaenops ocellatus*. *Marine Biology*, 121(1): 1-9.
- Wright, D. y F. Martin (1985) The effect of starvation on RNA:DNA ratios and growth of larval striped bass, *Morone saxatilis*. *Journal of Fish Biology*, 27: 479-485.
- Wu, Y. y R. Koenig (2000) Gene regulation by thyroid hormone. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 11: 207-211.
- Yamano, K. (2005) The Role of Thyroid Hormone in Fish Development with Reference to Aquaculture. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 39(3): 161-168.
- Yen, P. y W. Chin (1994) New advances in understanding the molecular mechanisms of thyroid hormone action. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 5: 65-72.
- Youson, J. (2007) Peripheral Endocrine Glands. I. The Gastroenteropancreatic Endocrine System and the Thyroid Gland. En: McKenzie, D., A. Farrell y C. Brauner (Ed.) Primitive Fishes. Fish Physiology Vol 26. Academic Press, San Diego, California, EUA. pp: 382-442.

Zambonino-Infante, J. y C. Cahu (2001) Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 130: 477-487.

Zar, J. (1984) *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall. New Jersey, USA. 718 p.