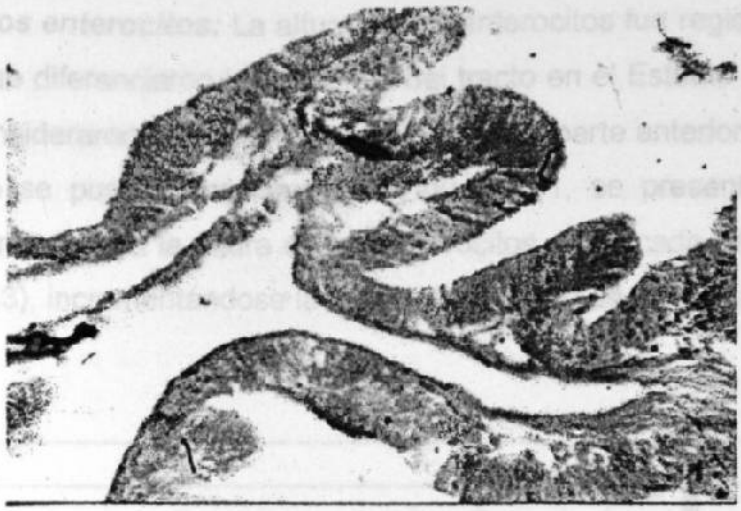


Figura 3.9.- Corte sagital del intestino anterior (***ia***) en donde se aprecia el epitelio columnar y la submucosa con tejido conectivo y muscular (40X), tinción con HyE.

Debajo del estómago se encuentra el hígado, el cual ocupa una gran parte de la cavidad corporal, las células del hígado (hepatocitos) son cúbicas con grandes vacuolas y en los huecos entre las células se observan vasos sanguíneos con gran cantidad de eritrocitos (Figura 3.10).

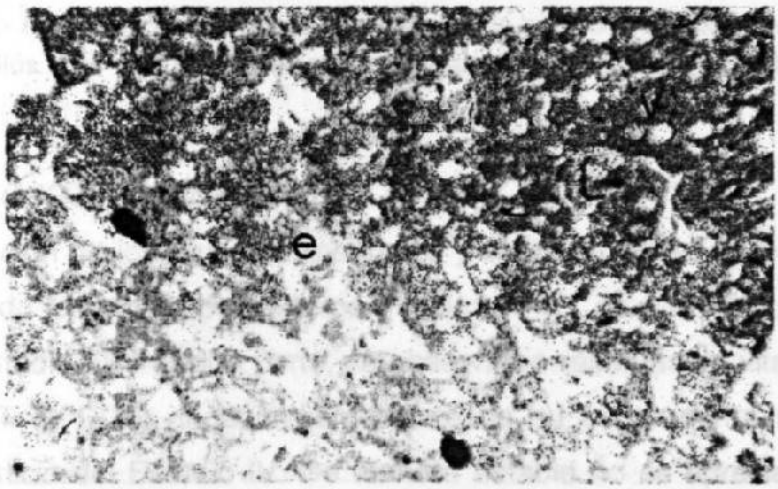


Figura 3.10.- Corte sagital de hígado en larva de 15 DDE, se aprecian las vacuolas (***v***) en los hepatocitos y vasos sanguíneos (eritrocitos; ***e***) (40X), tinción con HyE.

Altura de los enterocitos: La altura de los enterocitos fue registrada a partir del momento en que se diferenciaron las regiones del tracto en el Estadio III (14.5 mm LT), para lo cual se consideraron únicamente las células de la parte anterior del intestino. De esta forma, como se puede apreciar en la Figura 3.11, se presentaron diferencias significativas con respecto a la altura de los enterocitos entre cada estadío (F= 2280.; P= 0.000; gl= 140,3), incrementándose la altura con la edad de las larvas.

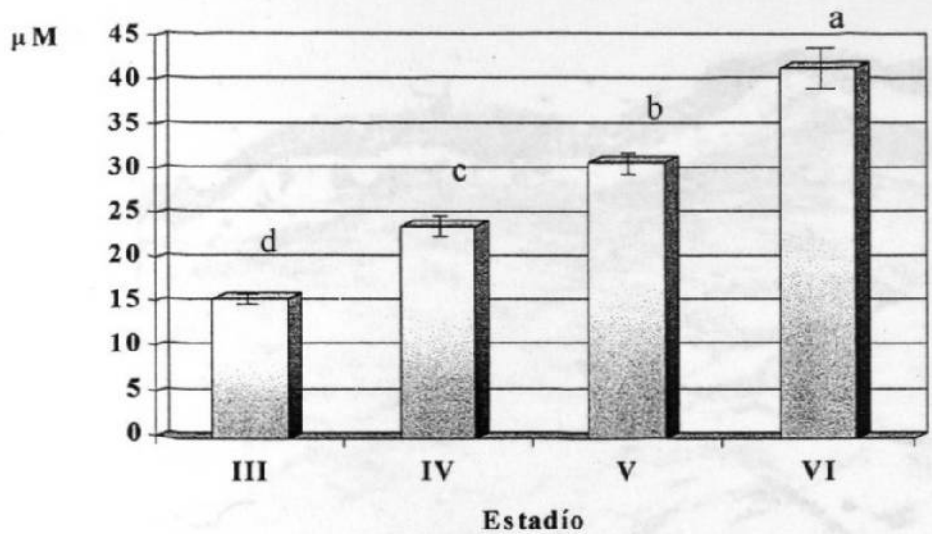


Figura 3.11.- Altura de los enterocitos (µm) de la parte anterior del intestino en larvas de catán de diferentes estadíos. Las distintas literales representan grupos significativamente diferentes ($P < 0.05$).

3.3.2 *EFECTO DE LA INANICION*

La separación de los grupos alimentados y en inanición se llevó a cabo a partir del 5 DDE cuando las larvas presentaron 19 mm de LT en promedio, es decir en la parte final del Estadío III. Por otra parte, se observaron reservas de vitelo en larvas de hasta 21 mm LT (8 DDE), independientemente de su condición nutricional, lo cual corresponde al inicio del Estadío IV. De manera notable no se apreciaron diferencias cualitativas en los tejidos del tracto digestivo de las larvas en inanición con respecto a aquellas que recibieron alimento durante este periodo.

Cuando las larvas tenían 10 DDE se observó que aquellas que no recibieron alimento exógeno presentaban el tejido muscular de la parte dorsal ligeramente reducido en volumen al ser comparadas con larvas de la misma edad que habían recibido alimento. Lo anterior también se observó en las paredes del tracto digestivo. Estas diferencias se acentuaron a los 12 DDE, en este momento se observaron algunas regiones del tracto con las paredes unidas y el tejido muscular del cuerpo presentó separaciones entre las fibras (Figura 3.12).

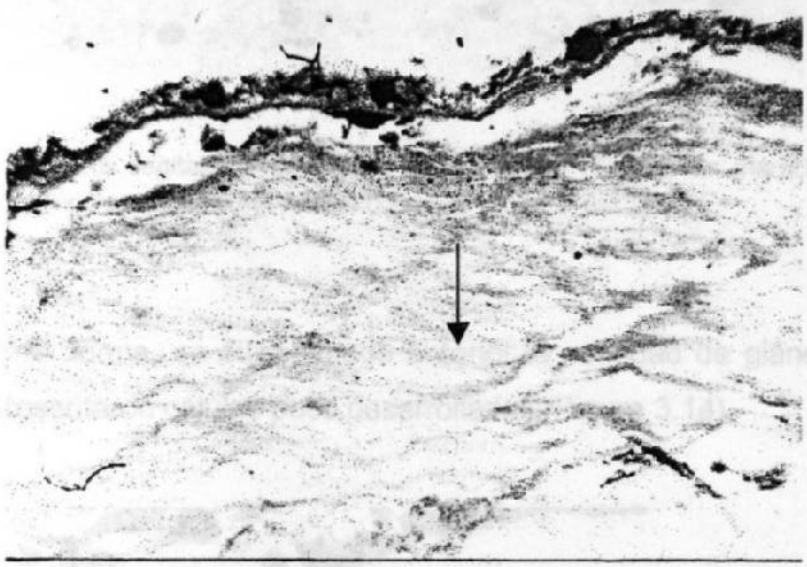


Figura 3.12.- Corte sagital de musculatura dorsal en una larva de 12 DDE mantenida en inanición. Se observa la separación entre las fibras (40X), tinción con HyE.

Cuando las larvas tenían 15 DDE, las diferencias anteriores se encontraron claramente marcadas con respecto a las larvas de la misma edad que recibieron alimento. Todos los tejidos se encontraron considerablemente reducidos en volumen y los espacios entre las fibras musculares del cuerpo fueron mayores. En los hepatocitos no se observaron las grandes vacuolas que están presentes en las larvas bien alimentadas (Figura 3.13).

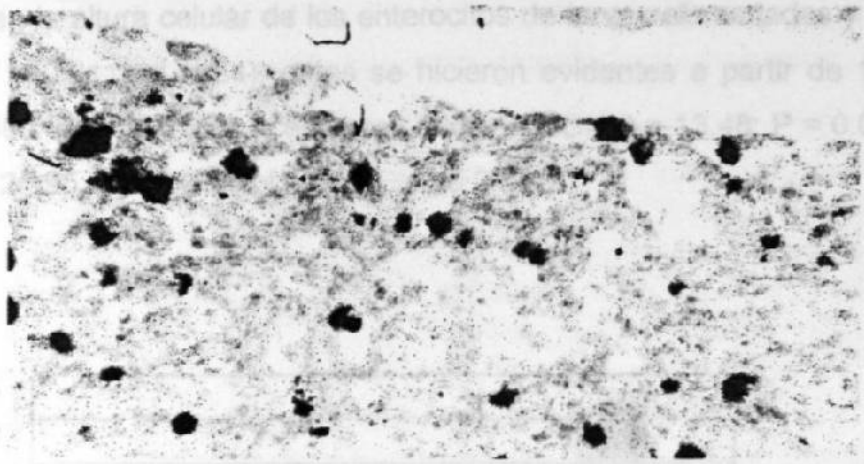


Figura 3.13.- Corte sagital de hígado en una larva de 15 DDE en inanición. Se observan hepatocitos pequeños sin vacuolas (40X), tinción con HyE.

De la misma forma, en el estómago anterior la cantidad de glándulas gástricas fue reducida y presentaron células poco desarrolladas (Figura 3.14).

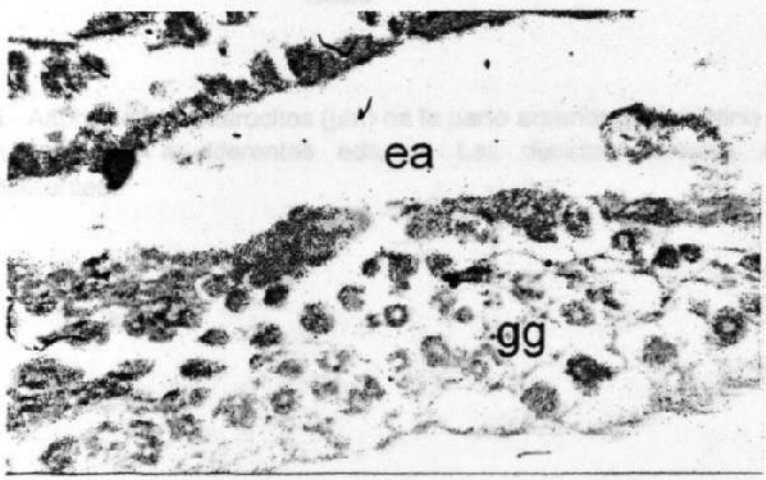


Figura 3.14.- Corte sagital de estómago anterior (***ea***) en larva de 15 DDE en inanición (40X), tinción con HyE.

Altura de los enterocitos: Aunque a los 8 DDE no se presentaron diferencias significativas en la altura celular de los enterocitos de larvas alimentadas y en inanición ($t = -1.28$; $P = 0.211$; $gl = 34$), estas se hicieron evidentes a partir de 10 DDE ($t = 15.07$; $P = 0.000$; $gl = 34$), y se acentuaron a los 12 DDE ($t = 13.48$; $P = 0.000$; $gl = 34$) y 15 DDE ($t = 25.95$; $P = 0.000$; $gl = 34$) (Figura 3.15.).

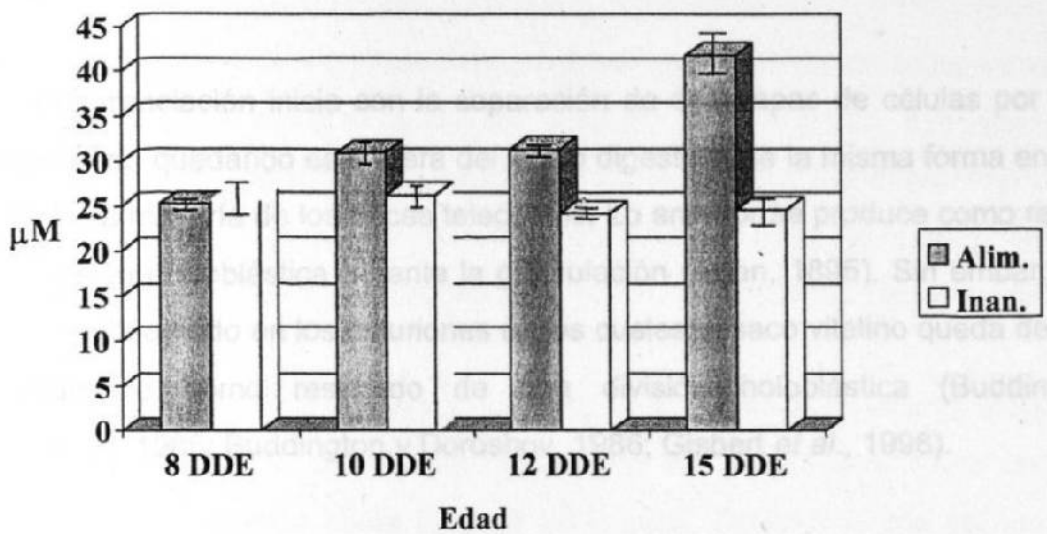


Figura 3.15.- Altura de los enterocitos (µm) de la parte anterior del intestino para larvas de catán alimentadas y en inanición a diferentes edades. Las distintas literales representan grupos significativamente diferentes.

3.4 DISCUSION

Al momento de la eclosión el tracto digestivo se encuentra representado únicamente por una linea de células indiferenciadas sobre el saco vitelino. Sin embargo, la diferenciación se produce ràpidamente y en el momento que tiene lugar la alimentación exógena (5 DDE), ya es posible encontrar todas las estructuras características del tracto digestivo, lo cual también coincide con el final de la etapa pre-larval.

La diferenciación inicia con la separación de dos capas de células por encima del saco vitelino quedando este fuera del tracto digestivo, de la misma forma en que se presenta en la mayoría de los peces teleósteos. Lo anterior se produce como resultado de una división meroblástica durante la gastrulación (Dean, 1895). Sin embargo, esto difiere de lo observado en los esturiones en los cuales el saco vitelino queda dentro del tracto digestivo como resultado de una división holoblástica (Buddington y Christofferson, 1985; Buddington y Doroshov, 1986; Gisbert *et al.*, 1998).

Debido a que el proceso de diferenciación ocurre inicialmente en la parte posterior, la primera sección que se observa desarrollada es la válvula espiral. Este patrón de diferenciación que va de la región posterior a la anterior solo ha sido observado en los esturiones. Al mismo tiempo, el grado de desarrollo que presenta el tracto digestivo en las larvas de catán al momento de iniciar la alimentación exógena, los coloca dentro de un reducido grupo de especies como los esturiones y algunos salmónidos, los cuales presentan un estómago diferenciado con glándulas gástricas funcionales en este momento (Buddington y Christofferson, 1985; Dabrowski, 1986; Buddington y Doroshov, 1986; Gawlicka *et al.*, 1995; Gisbert *et al.*, 1998), contrariamente al resto de los teleósteos.

Posteriormente, al inicio de la alimentación exógena, durante los estadíos IV, V y VI, se sigue observando un incremento en el tamaño de las células del tracto

digestivo (Figura 3.11), lo que permite suponer que, durante este periodo se produce un proceso de maduración del tracto digestivo, el cual se ve reflejado en el nivel de actividad de las enzimas digestivas, así como en la de absorción de nutrientes por los enterocitos. De esta forma, en el caso del catán la maduración del sistema digestivo estaría definida por un incremento en la función del estómago, así como por cambios estructurales tales como el desarrollo de pliegues intestinales y el alargamiento en altura de los enterocitos y su contenido de organelos (Dabrowski, 1986).

El seguimiento histológico permitió observar la existencia de reservas de vitelo en la cavidad corporal hasta el octavo día después de la eclosión. Esta observación viene a confirmar los periodos de duración propuestos para las diferentes fases de nutrición en las larvas de catán (Capitulo 2). Definiéndose de 1 a 4 DDE fase lecitotrófica; de 5 a 8 DDE fase lecitoexótrofica; de 9 DDE en adelante fase exótrofica.

La existencia de estas reservas de vitelo contribuyen a explicar la ausencia de diferencias cualitativas y cuantitativas (altura de los enterocitos) entre las larvas alimentadas y en inanición hasta la edad de 8 DDE. De hecho, una vez que estas reservas desaparecen, rápidamente (a 10 DDE) se pueden observar diferencias significativas en la altura de los enterocitos entre estos dos grupos, siendo fácilmente separados a los 12 y 15 DDE mediante la utilización de este índice de condición, lo que hace de esta característica un instrumento valioso para la evaluación de dietas artificiales en el cultivo de larvas de catán (Hunter, 1976; Lasker, 1981; Theilacker y Watanabe, 1989; Oozeki *et al.*, 1989; McFadzen *et al.*, 1994; Theilacker y Porter, 1995).

La separación de las fibras musculares del cuerpo observada en las larvas de catán en inanición concuerda con las observaciones de O´Connell (1976) para larvas de anchoveta en inanición. Así mismo, las células hepáticas de forma irregular con gránulos oscuros alrededor y el citoplasma condensado ha sido señalado también

como otra característica presente en larvas de peces en inanición (O´Connell, 1976; Theilacker, 1978).

Las características anteriores permiten situar a las larvas de catán dentro de un grupo de peces con un sistema digestivo más desarrollado del que presentan la mayoría de las larvas de otras especies. Sobre esta base es posible suponer que sería factible alimentar a las larvas de catán con dietas artificiales, desde el inicio de la alimentación exógena como sucede con algunos salmónidos y esturiones (Dabrowski *et al.*, 1985). Esto a su vez permitiría reducir la utilización de presas vivas y prolongar el periodo de cultivo para que las larvas presentaran un mayor grado de desarrollo y una mejor condición nutricional al momento de ser liberadas, o bien sería posible prolongar su cultivo hasta obtener tallas comerciales, con lo que se reduciría de esta forma la presión sobre las poblaciones naturales.

CAPITULO 4: ONTOGENESIS ENZIMATICA DEL CATAN (*Atractosteus spatula*).

4.1 ANTECEDENTES

El sistema digestivo de los peces presenta varias particularidades, de manera general, se considera que el sistema digestivo de las larvas de peces es más simple que el del adulto (Lauff y Hofer, 1984). Por otra parte, existen especies que en su fase adulta no desarrollan estómago y por lo tanto no producen pepsina, basando toda la actividad proteolítica en enzimas que actúan a un pH alcalino, este proceso digestivo es llevado a cabo en el intestino (Jany, 1976; Lauff y Hofer, 1984). Al mismo tiempo se ha estimado que la actividad proteolítica es menor en peces herbívoros que en peces omnívoros y carnívoros (Hofer y Schiemer, 1981).

Durante el desarrollo, típicamente, se presentan tres fases para llegar a la maduración del sistema digestivo. Primeramente, durante la etapa de alimentación endógena, se produce la diferenciación del tracto y se presenta una actividad enzimática incipiente. La segunda fase se inicia con la alimentación exógena, durante la cual el sistema digestivo no esta completamente diferenciado y por ende la digestión es semejante a la de las especies sin estómago, caracterizadas por su baja capacidad digestiva lo cual compensan por medio de la macro-pinocitosis de proteínas y su digestión intracelular. Finalmente, existe una tercera fase que concuerda con la metamorfosis durante la cual el sistema digestivo se completa, en esta etapa se presenta una actividad enzimática similar a la de juveniles (Budington, 1985). Sin embargo, este patrón varía con las especies, así por ejemplo cuando los esturiones inician la alimentación exógena ya están formadas las glándulas gástricas y la capacidad proteolítica se asemeja al de los juveniles (Budington, 1985; Budington y Doroshov, 1986; Gawlicka *et al.* 1995), esto les permite, al igual que a los salmónidos, ser mantenidos desde el primer alimento exclusivamente con dietas artificiales (Dabrowski *et al.*, 1985).

En otro orden de ideas, se ha planteado que los cambios en el desarrollo del sistema digestivo están intimamente relacionados con la tasa de síntesis de proteínas y consecuentemente con la tasa de crecimiento corporal. Esto es el reflejo de la maduración del sistema digestivo la cual no sólo implica la formación del estómago sino un incremento en su función, el desarrollo de estructuras que permiten incrementar la absorción de nutrientes como la formación de pliegues intestinales y el alargamiento en altura de los enterocitos y su contenido de organelos (Dabrowski, 1986). Por lo cual, se considera que la diferenciación del sistema digestivo finaliza con la formación de glándulas gástricas funcionales en el estómago y este evento se encuentra estrechamente relacionado con la terminación del periodo larval (Person-Le Ruyet, 1989; Verret y Van Tongeren, 1989; Verret *et al.*, 1992; Walford y Lam, 1993; Moyano *et al.*, 1996).

Los cambios que se presentan durante el desarrollo del sistema digestivo implican igualmente cambios en el tipo de enzimas digestivas producidas, así como en el nivel de actividad de las mismas. El funcionamiento incompleto del sistema digestivo es una de las principales razones a las cuales se atribuye la dificultad que tienen las larvas de peces para utilizar dietas artificiales, ya que existe una correlación marcada entre el incremento de la actividad enzimática y el funcionamiento del estómago y por consecuencia con la habilidad de digerir los alimentos artificiales, por lo cual se considera que el tiempo más apropiado para remplazar el alimento vivo por dietas artificiales debe concordar con la maduración del sistema digestivo (Alliot *et al.*, 1977; Lauff y , 1984; Buddington, 1985; Ueberschar, 1985; Person-Le Ruyet, 1989; Dabrowski y Culver, 1991; Moyano *et al.*, 1996).

A pesar de que las larvas de la mayoría de las especies no presentan estómago funcional al iniciar la alimentación exógena, en este periodo han sido detectadas casi todas las enzimas, con excepción de la pepsina (Alliot *et al.*, 1977; Baragi y Lovell, 1986; Gildberg, 1988; Zambonino y Cahu, 1994). Sin embargo, estas enzimas presentan una actividad muy baja, como ha sido observado en *Dicentrarchus labrax*

(Alliot *et al.*, 1977; Vu 1983; Zambonino y Cahu, 1994), *Scophthalmus maximus* (Ueberschar, 1985; Munilla y Stark, 1989), *Solea solea* (Clark *et al.*, 1986), *Morone saxatilis* (Baragi y Lovell, 1986), *Coreogonus lavaretus* (Segner *et al.*, 1989), *Clarias gariepinus* (Verreth *et al.*, 1992), *Lates calcarifer* (Walford y Lam, 1993) y *Sparus aurata* (Munilla y Saborido, 1996). La principal actividad enzimática detectada corresponde al tipo tripsina, quimotripsina, aminopeptidasa, amilasa y esterasas no específicas. Estas actividades generalmente se incrementan con la edad, hasta el momento en que inicia la secreción de pepsina en el estómago, en este momento la actividad de las enzimas intestinales disminuye ligeramente y posteriormente se estabiliza a un nivel similar al encontrado en los juveniles y adultos (Zambonino y Cahu, 1994). El tiempo requerido para que se produzcan estos cambios de actividad varía dependiendo de la especie, y puede ir desde 2 días en *Clarias gariepinus* hasta 40 días en el turbot y *Sparus aurata* (Moyano *et al.*, 1996). Por otra parte, en algunos peces como los coreogónidos se presentan diferentes isoenzimas de tripsina para cada una de las etapas del desarrollo larvario (Dabrowski, 1996).

En el otro extremo existe un reducido número de especies cuyas larvas presentan un tracto digestivo desarrollado, con el estómago diferenciado y glándulas gástricas funcionales, al momento de iniciar la alimentación y con una capacidad proteolítica similar a la de los juveniles. Este solo es el caso de los salmónidos y esturiones (Buddington, 1985; Buddington y Doroshov, 1986; Gawlicka *et al.*, 1995). Los huevos de estas especies se caracterizan por presentar un alto contenido de lípidos, de los cuales cerca del 60 % son consumidos antes de que inicie la alimentación exógena (Gershanovich, 1991). En los esturiones han sido diferenciadas tres fases del desarrollo, el cual inicia con el estadio vitelino caracterizado por una baja actividad enzimática, seguido por el inicio de la alimentación, el cual coincide con la primera secreción gástrica y una elevada actividad amilásica y lipásica, y finalmente ocurre la metamorfosis a la forma juvenil la cual se caracteriza por una disminución en las actividades amilásica y lipásica (Buddington, 1985). Estas fases han sido relacionadas con cambios en el ciclo de vida, hábitos de alimentación natural y

posiblemente con los requerimientos nutricionales de los esturiones (Buddington y Doroshov, 1986). Considerando lo anterior, resulta importante señalar que el tracto digestivo del catán presenta una semejanza estrecha al de los esturiones, el cual presenta un epitelio ciliado en el estómago del adulto, así como una válvula espiral en la parte posterior del intestino, siendo este el sitio en donde ocurre la mayor parte de la digestión de proteínas durante el periodo larvario de los esturiones (Buddington, 1985). Por otra parte, se han observado diferencias cuantitativas y cualitativas en cuanto a la actividad enzimática entre las distintas regiones del tracto digestivo de los esturiones, lo cual es indicativo de un alto grado de especialización respecto a los procesos de digestión y absorción (Gawlicka *et al.*, 1995).

Se ha sugerido que la baja actividad en las enzimas digestivas al inicio de la alimentación puede ser compensada mediante otro tipo de procesos como la macro-pinocitosis de proteínas en el intestino posterior, proceso que involucra la actividad de enzimas proteolíticas a nivel intracelular (Tanaka, 1971 y 1972; Hofer y Schiemer, 1982; Walford y Lam, 1993). Otro mecanismo compensatorio señalado es el aporte de enzimas exógenas, las cuales podrían provenir del alimento vivo (Dabrowski, 1979; Lauff y Hofer, 1984; Dabrowski, 1986), igualmente, se ha propuesto que estas enzimas exógenas podrían actuar como activadores de los zimógenos presentes en las larvas (Munilla y Stark, 1989; Dabrowski *et al.*, 1992). Sin embargo, se ha podido detectar actividad de proteasas alcalinas aún antes de que se abra la boca y comience la alimentación exógena, contradiciendo de esta forma la teoría de activadores enzimáticos exógenos (Moyano *et al.*, 1996). Como otro argumento del papel potencial de las enzimas exógenas, se ha sugerido que la disminución de la actividad tríptica al momento de iniciar la digestión ácida, podría deberse a una reducción en la contribución de las enzimas exógenas tipo tripsina provenientes del alimento vivo, como resultado de su desnaturalización en el estómago ya funcional (Walford y Lam, 1993). Es muy probable que las enzimas exógenas contribuyan en cierta forma en la digestión de las larvas, sin embargo, aun no se ha esclarecido la manera en que actúan. Hasta el momento, se señala a la tripsina como la enzima clave, debido a que

se le encuentra en la mayoría de los grupos zoológicos así como por su capacidad para activar zimógenos de otras proteasas (Munilla y Stark, 1989). De cualquier forma, la digestión luminal en las larvas de peces, ya sea por enzimas endógenas y/o exógenas representa la ruta principal de obtención de nutrientes (Dabrowski y Culver, 1991).

4.2 MATERIAL Y METODO

4.2.1 ORGANISMOS EXPERIMENTALES

Se obtuvieron larvas recién eclosionadas del Centro Acuícola Tancol de la SEMARNAP en Tampico, el 1 de junio de 1999, estas fueron transportadas en bolsas de plástico, las cuales fueron llenadas con oxigeno, a las instalaciones del Grupo Ecofisiologia en la Universidad Autónoma de Nuevo León. Se colocaron 2,500 larvas en una canaleta de fibra de vidrio de 230 cm de largo, 70 cm de ancho y 30 cm de altura, con un volumen de agua de 480 L. La temperatura del agua se mantuvo a 27 ± 1 °C y se proporcionó oxígeno constante mediante un compresor con el fin de mantener los niveles a 6 ppm. A partir del momento en que las larvas iniciaron la alimentación exógena, se les suministraron nauplios de *Artemia salina* de la variedad *San Fransico Bay* recién eclosionados, en dos raciones diarias de tal forma que siempre existiera un exceso de nauplios para que las larvas se alimentaran *ad libitum.*

Diariamente, a partir del tercer día después de la eclosión (3 DDE), se tomaron muestras de 100 larvas antes de proporcionar el alimento. El muestreo finalizó a los 15 DDE cuando las larvas adquirieron la forma del adulto. Las larvas fueron pesadas en grupo y posteriormente fueron disectadas una a una en una caja de petri, colocada sobre hielo, con el fin de extraer el tracto digestivo completo de cada larva el cual sería utilizado posteriormente para preparar los extractos enzimáticos.

Un catán juvenil, de cuatro meses de edad (450 mm de longitud total), obtenido de las crías producidas en el Centro Acuicola de Tancol en 1998, fue disectado en octubre de ese año para extraer el tracto digestivo y preparar extractos enzimáticos de referencia a partir del estómago, ciegos pilóricos, intestino anterior e intestino posterior.

4.2.2 EXTRACTOS ENZIMATICOS

El tracto digestivo de las larvas de cada muestra fue homogeneizado en agua destilada en una proporción 1:5 (p/v) a una temperatura de 4 °C, utilizando un

homogenizador de tejidos marca Polytron[MR]. Posteriormente, el homogenizado fue centrifugado a 10,000 rpm durante 15 minutos a la misma temperatura. El sobrenadante fue filtrado y dividido en allcuotas de 0.1 mL las cuales se almacenaron en nitrógeno líquido y en su momento fueron utilizadas como extracto enzimático en las pruebas para la determinación de la actividad enzimática.

Determinación de proteína: Se determinó la concentración de proteína para cada extracto utilizando azul de comassie G250 de acuerdo al método de Bradford (1976). Como proteína de referencia se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) en concentraciones de 10 a 100 mg para elaborar una curva estándar mediante la lectura de la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro marca Spectonic modelo Genesis 2.

4.2.3 ACTIVIDAD PROTEOLITICA TOTAL

Efecto del pH: Para determinar el efecto del pH sobre la actividad proteolítica total se utilizó BSA al 1% en agua destilada como sustrato. Las soluciones buffer utilizadas fueron Citrato-Fosfato en un rango de pH de 2.2 a 7 y Glicina-NaOH-NaCl en un rango de pH 8.5 a 12. La mezcla de reacción consitió en 0.5 mL del buffer al pH deseado, 0.5 mL de BSA y 0.1 mL de extracto enzimático, esta fue incubada durante 60 minutos a 25 °C. La reacción fue detenida por la adición de 0.5 mL de ácido tricloracético (TCA) frío al 10%. Posteriormente, se mantuvo durante 30 minutos a 4 °C, se centrifugo a 5,000 rpm durante 15 minutos a la misma temperatura y se registró la absorbancia del sobrenadante a 280 nm. Un blanco fue preparado de la misma forma salvo que se adicionó el TCA antes de la incubación. La actividad de cada muestra (para todas las pruebas analíticas) fue determinada por triplicado y expresada como el cambio en absorbanica de 0.001 por minuto por miligramo de proteína en el extracto.

Actividad proteolítica alcalina: En este caso se utilizó azocaseina como sustrato (Galgani y Nagayama, 1986). La mezcla utilizada consistió en 0.5 mL de azocaseina al 0.2 % con 0.5 mL de buffer Universal pH 8.4 y 0.1 mL de extracto

enzimático. Esta fue incubada a 25 °C durante 60 minutos y fue detenida con 0.5 mL de TCA frío al 10%. Posteriormente, se mantuvo durante 30 minutos a 4 °C, se centrifugo a 5,000 rpm durante 15 minutos a la misma temperatura y se registro la absorbancia del sobrenadante a 366 nm. La actividad fue expresada de la misma forma que en el caso anterior.

Actividad proteolítica ácida: Para la determinación de esta actividad se utilizó hemoglobina al 1 % como sustrato (Anson, 1938). La mezcla de reacción consistió en 0.5 mL de sustrato con 0.5 mL de buffer Universal pH 3.0 y 0.1 mL de extracto. Esta posteriormente se incubó durante 60 minutos a 25 °C y se detuvo la reacción con 0.5 mL de TCA frío al 10% , se mantuvo a 4° C durante 30 min. y a continuación se centrifugó a 5,000 rpm durante 5 minutos a 4° C y por último se registró la absorbancia a 280 nm.

4.2.4 IDENTIFICACION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA MEDIANTE ELECTROFORESIS

Proteasas alcalinas: Para identificar la actividad de las proteasas alcalinas en el tracto digestivo de larvas y juveniles de catán, se realizaron electroforesis en condiciones desnaturalizantes en presencia de lauril (dodecil) sulfato de sodio (SDS), utilizando un sistema de gel discontinuo (gel almacenador y gel separador), mediante la técnica descrita por Laemmli (1970), modificada por García-Carreño *et al.*, (1993) para visualizar actividad proteolítica alcalina, la cual consiste básicamente en la preparación de las muestras, eliminando el mercapto-etanol y en este caso las muestras no fueron calentadas.

Las electroforesis se realizaron en una cámara de electroforesis vertical, Dual Mini Gel Unit (Scientific Co.), con placas de 10 x 11.3 x 0.75 cm con capacidad para 10 muestras por gel. El gel concentrador fue preparado a una concentración de

poliacrilamida (PAA) de 4% y gel separador a 15% PAA. En el Anexo 1 se detalla el procedimiento para la elaboración de los geles.

Se corrieron dos geles al mismo tiempo, uno de los cuales fue procesado para visualizar las proteínas presentes en los extractos y el otro para observar las bandas con actividad proteolítica. Se utilizó Tris - Glicina 0.0192M, SDS 0.1%, pH 8.3, como buffer para cámara. Las muestras fueron preparadas mezclando los extractos enzimáticos con el buffer de muestra (Tris-HCl 0.5M, pH 6.8, SDS 2 %, glicerol 20 % y azul bromofenol 0.04 %), en proporción 1:1, procurando aplicar de 35-40 mg de proteína por pocillo con una micro-jeringa Hamilton. La cámara fue conectada a una fuente de poder Pharmacia® EPS 600 a un voltaje de 100V y a una intensidad de 60 mA por gel, durante 90 minutos, utilizando un baño con recirculación para mantener la temperatura de los geles a 4 °C.

Inmediatamente después de finalizada la electroforesis, los geles utilizados para visualizar las proteínas de los extractos, fueron fijados con TCA al 10%. Mientras que los geles para detectar la actividad proteolítica, fueron sumergidos en una solución de caseína al 1% en un buffer Tris-HCl 50 mM pH 9.0, durante 30 minutos a 4° C. Posteriormente, fueron cambiados a otra solución similar a 25° C para ser incubados durante 90 minutos. En seguida fueron lavados en agua destilada, para remover el exceso de sustrato y posteriormente fueron fijados con TCA al 10%.

Los geles fueron teñidos de acuerdo a la metodología de Weber y Osborn (1969). En breve, estos fueron sumergidos, durante toda la noche a temperatura ambiente, en una solución compuesta de 0.1% de azul de comassie R-250 en metanol, ácido acético y agua destilada en una proporción 40:10:50 respectivamente. Para revelar los geles se utilizó una solución de metanol, ácido acético y agua destilada (40:10:50). Posteriormente, los geles fueron sumergidos en agua destilada para que se hidrataran. Finalmente, con el propósito de ser conservados, los geles fueron cubiertos con papel celofán y extendidos sobre una placa de cristal para ser deshidratados.

En los geles las proteínas se revelaron como bandas azules sobre un fondo transparente. Mientras que las enzimas con actividad proteolítica fueron reveladas como bandas de color blanco o transparente sobre un fondo azul, como si se tratara de un negativo.

El peso molecular de las proteasas alcalinas encontradas fue determinado utilizando un kit comercial (SIGMA^{MR} MW-SDS-70) que contenía albúmina bovina, albúmina de huevo, pepsina, tripsinógeno, b-lactoglobulina y lisozima.

Proteasas ácidas: Para la determinación de las proteasas ácidas se utilizó la metodología propuesta por Alarcón (1997). Estas electroforesis se desarrollaron bajo condiciones nativas, es decir en ausencia de SDS. El procedimiento para la preparación de los geles se resume en el Anexo 2. La preparación de los geles y condiciones en las que se llevaron a cabo las electroforesis fue igual a la descrita para proteasas alcalinas, únicamente variando en el buffer de muestra (Tris-Acido Fosfórico 0.1M, pH 5.5, con glicerol 20% y azul de bromofenol 0.02%) y el buffer de cámara (Tris-Glicina 0.62 M, pH 7.0).

Después de la electroforesis los geles se sumergieron en HCl 0.1M para disminuir el pH a 3.0 (el buffer de muestra presente en el frente cambia de azul a amarillo). Posteriormente, se colocaron en una solución de hemoglobina al 0.25% en un buffer Universal pH 2.0 a 4° C durante 30 minutos. En seguida se pasaron a una solución similar para ser incubados a 25 °C durante 90 minutos. A continuación, los geles fueron lavados con agua destilada para remover el exceso de sustrato y fijados en con TCA al 10% . Los proceso de coloración, revelado y conservación fueron los mismos que se utilizaron en el caso de las proteasas alcalinas.

Efecto de inhibidores: El tipo de actividad proteolítica fue parcialmente caracterizada mediante la utilización de inhibidores enzimáticos. Para este efecto se siguió la metodología propuesta por García-Carreño (1993), que consiste en mezclar

40 ml del extracto con 10 ml de la solución concentrada del inhibidor correspondiente para su posterior incubación durante una hora a 25 °C, antes de realizar la electroforesis bajo las condiciones descritas. Los inhibidores utilizados, su especificidad y concentración utilizada se presenta en la Tabla 4.1.

INHIBIDOR	ESPECIFICIDAD	SOLUCION CONCENTRADA	SOLVENTE
PMSF	serina proteasa	100mM	propanol
SBTI	serina proteasa	12mM	agua destilada
TLCK	tripsina	10mM	HCl 1mM
EDTA	metal-proteasa	0.5M	agua destilada
Pepstatina	pepsina		

Tabla 4.1.- Inhibidores utilizados para la caracterización de enzimas proteolíticas.

4.2.5 ACTIVIDAD PROTEOLITICA ESPECIFICA

El procedimiento general consistió en mezclar 0.5 mL de sustrato con 0.5 mL de buffer para adecuar el pH y poder adicionar 0.1 mL de extracto enzimático. La reacción se llevo a cabo en una celda de cuarzo, en un espectrofotómetro SPECTRONIC, modelo GENESIS 2, a una temperatura de 25° C. La actividad enzimática fue registrada mediante el cambio en absorbancia durante 10 minutos a partir de un valor establecido de longitud de onda para cada sustrato. La actividad fue expresada como unidades enzima (UE) por minuto por miligramo de proteína en el extracto, siendo equivalente 1 UE a un cambio de 0.001 en absorbancia. Los sustratos utilizados, así como el tipo de actividad que permiten detectar y el método de referencia se presentan en la Tabla 4.2.

ENZIMA	SUSTRATO	BUFFER	A° nm	METODO
Tripsina	Na-p-tosil-l-arginina metil ester (TAME) 0.001M	Tris 0.1M (pH 7.4) con $CaCl_2$ 0.01M	247	Hummel (1959)
Tripsina	N-benzoil-arginina pNitroanilida (BAPNA) 2mM	Tris 50 mM (pH 8.4) con $CaCl_2$ 20mM	405	Erlanger (1961)
Quimotripsina	N-benzoil-l-tirosina etil ester (BTEE) 0.001M	Tris 0.1M (pH 7.4) con $CaCl_2$ 0.01M	254	Hummel (1959)
Quimotripsina	N-glutaril-fenilalanina pNitroanilida (GPNA) 2mM	Tris 50 mM (pH 8.4) con $CaCl_2$ 20mM	405	Lauff y Hofer (1984)
Aminopeptidasa	L-leucinamida 0.125 M	Tris 0.1M (pH 7.4) con $CaCl_2$ 0.01M	238	Clark *et al.* (1986)
Aminopeptidasa	L-leucina pNitroanilida (LNA) 2mM	Tris 50 mM (pH 8.4) con $CaCl_2$ 20μM	405	Lauff y Hofer (1984)

Tabla 4.2.- Sustratos, tipo de enzima que detectan, condiciones del ensayo y método de referencia utilizado.

4.2.6 FOSFATASAS ACIDA Y ALCALINA

Se utilizó p-nitrofenil fosfato como sustrato de acuerdo al método descrito por Moyano *et al.* (1996). El procedimiento para determinar este tipo de actividad consistió en incubar, durante 10 minutos a 25 °C, 0.1 mL del extracto con 0.1 mL de sustrato diluido en buffer acetato (pH 4.8) para la detección de fosfatasas ácidas o en un buffer dietanolamina (pH 9.8) para el caso de las fosfatasas alcalinas. Posteriormente, se agregaron 10 mL de NaOH (0.05 N) para detener la reacción y se registró la absorbancia a 405 nm. La actividad fue expresada de la misma forma que para las proteasas especificas.

4.2.7 ACTIVIDAD AMILASICA

La actividad de tipo a-amilasa fue determinada utilizando almidón como sustrato (Brenfeld, 1951). El método consistió en mezclar una solución de almidón al 1%, en 0.4 mL de buffer de fosfatos (monosodico y disodico) al 0.02M conteniendo 0.006M de

cloruro de sodio a pH 6.9 y 0.1 mL de extracto enzimático. La mezcla fue incubada durante 60 minutos y posteriormente se agregó 1 mL de ácido dinitrosalicílico. Los tubos se colocaron en baño maría durante 5 minutos y a continuación se enfriaron a temperatura ambiente, para registrar la absorbancia a 540 nm.

ACTIVIDAD ESTERASICA

La actividad de tipo esterasa se determinó utilizando p-nitrofenil acetato como sustrato (Munilla y Starck, 1990). La mezcla consistió en 1 mL de sustrato (0.002M) en buffer Tris-HCl 50 mM (pH 7.1) con 0.1 mL. de extracto enzimático incubado durante 10 min. a 37°C. La actividad se registró por el incremento en la absorbancia a 405 nm.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 ACTIVIDAD PROTEOLITICA TOTAL

En la Figura 4.1 se muestra el efecto del pH sobre la actividad proteolítica total. Se puede observar que tanto en las larvas de 5 DDE como en las de 8 DDE se presentan dos picos de actividad cercanos a pH 2.2 y pH 8.4 y únicamente cambia el nivel de actividad incrementandose ésta con la edad.

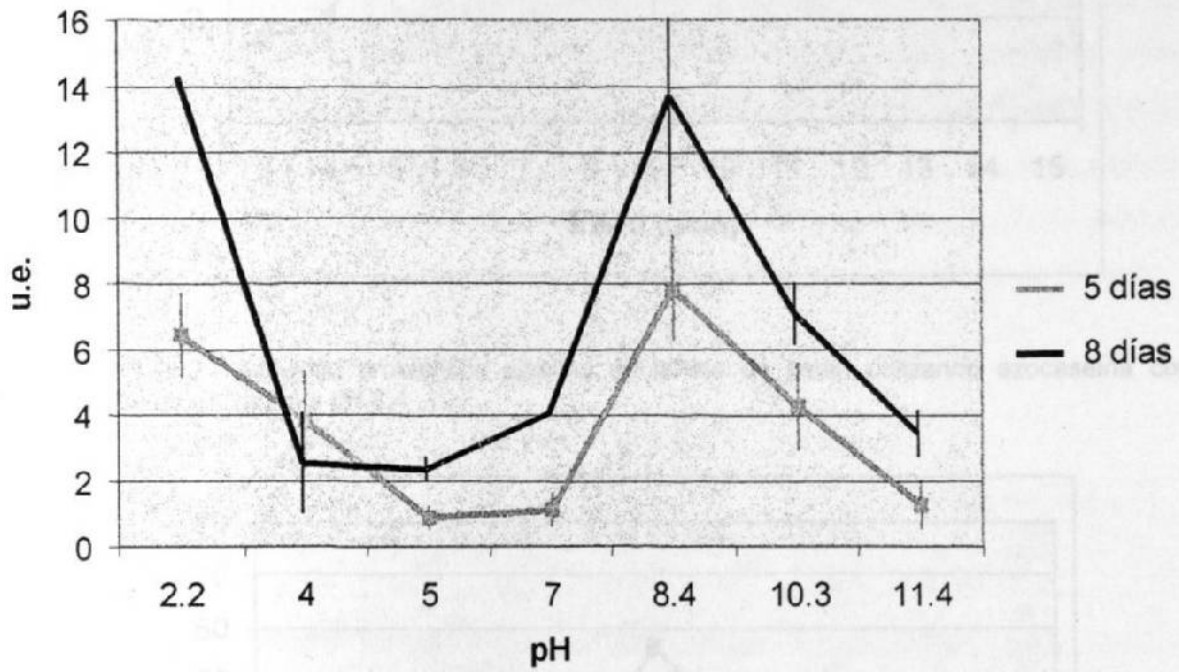


Figura 4.1.- Efecto del pH sobre la actividad proteolítica total en larvas de 5 y 8 DDE. La actividad fue determinada utilizando albúmina al 1% en buffer citrato-fosfato (pH 2.2 a 7) o glicina-NaOH (pH 8 a 12)

Por otra parte, como se puede observar en la Figura 4.2, la actividad proteolítica alcalina se incrementó hasta el 5 DDE y posteriormente se mantuvo a niveles constantes. Cabe señalar que la actividad proteolítica ácida se comportó de manera similar, solo que el nivel de actividad fue 10 veces mayor a la actividad alcalina (Figura 4.3).

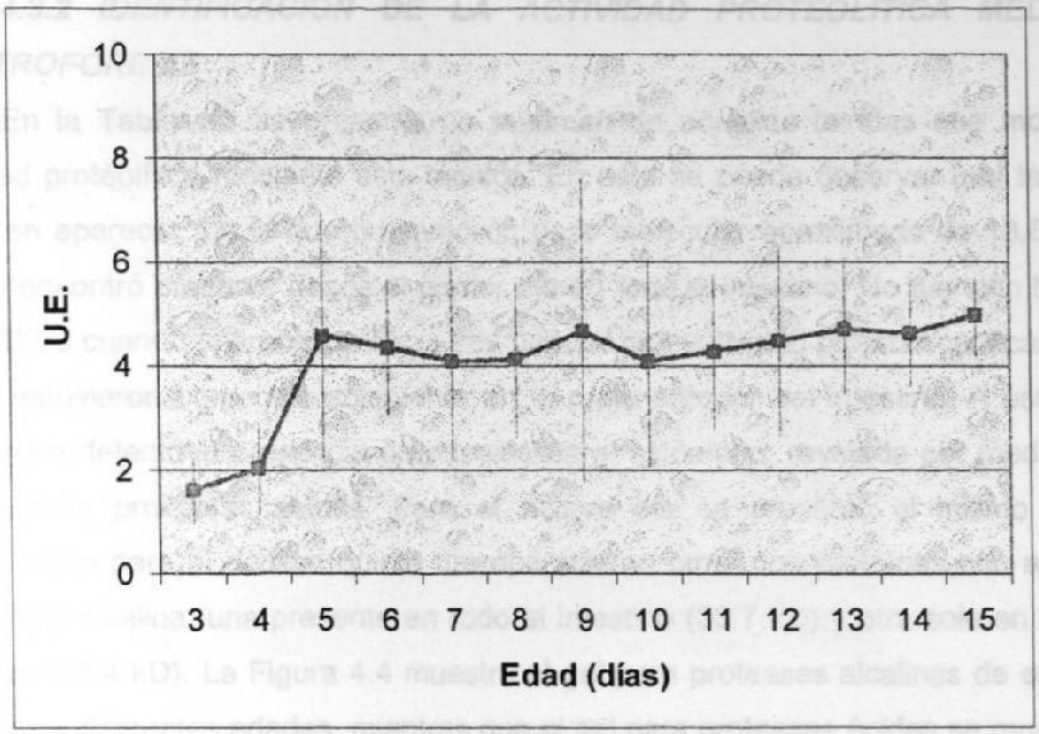


Figura 4.2.- Actividad proteolítica alcalina de larvas de catán utilizando azocaseína como sustrato en buffer universal a pH 8.4

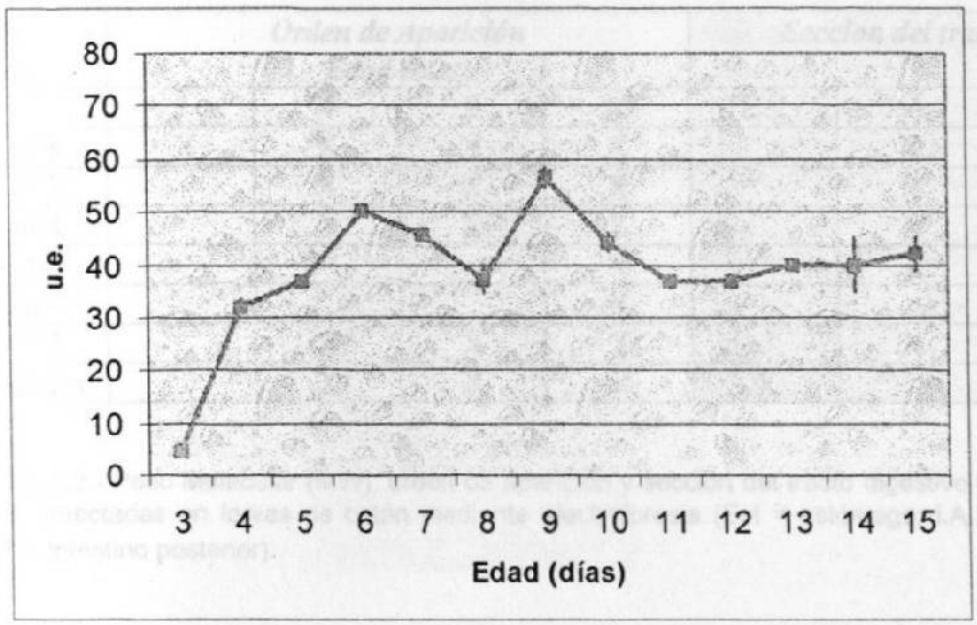


Figura 4.3.- Actividad proteolítica ácida en larvas de catan utilizando hemoglobina 0.25 % en buffer universal pH 3.0

4.3.2 IDENTIFICACION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA MEDIANTE ELECTROFORESIS

En la Tabla 4.3 se presenta un resumen de aquellas bandas que mostraron actividad proteolítica mediante esta técnica. En esta se puede observar que la primer banda en aparecer fue la que presentó un peso molecular aproximado de 18.8 kD, la cual se encontró presente desde el primer día en todo el intestino. No fue sino hasta el cuarto DDE cuando aparecieron otras tres bandas con actividad proteolítica alcalina, las cuales estuvieron presentes solamente en la parte anterior del intestino. A esta edad también se detectó la presencia de pepsina en el estómago, revelada por medio de la técnica para proteasas ácidas. Para el octavo día se presentó el mismo patrón, mientras que para el décimo quinto día aparecieron otras dos proteínas con actividad proteolítica alcalina, una presente en todo el intestino (33.7 kD) y otra solo en la parte posterior (36.4 kD). La Figura 4.4 muestra el gel para proteasas alcalinas de extractos de larvas a diferentes edades, mientras que el gel para proteasas ácidas se muestra en la Figura 4.5.

No.	*MW (Kd)*	*Orden de Aparición Edad (días)*				*Seccion del tracto*		
		1	*4*	*8*	*15*	*Est*	*I.A.*	*I.P.*
1	18.8	X	X	X	X		X	X
2	23.3		X	X	X		X	
3	26.8		X	X	X		X	
4	33.7				X		X	X
5	36.4				X			X
6	47.3		X	X	X		X	
7	Pepsina		X	X	X	X		

Tabla 4.3.- Peso Molecular (MW), orden de aparición y sección del tracto digestivo de enzimas proteolíticas detectadas en larvas de catán mediante electroforesis (Est = estómago; I.A. = intestino anterior; I.P = intestino posterior).

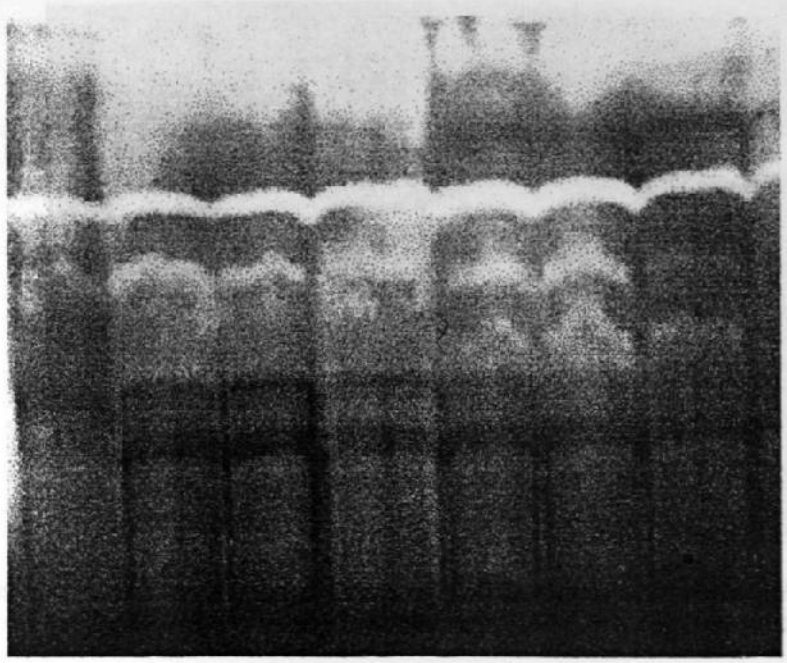


Figura 4.4.- Gel de electroforesis SDS-PAGE incubado en caseína al 1% a pH 9.0 mostrando las bandas con actividad proteolítica alcalina en el tracto digestivo de larvas de catán de 3 a 8 DDE de isquierda a derecha.

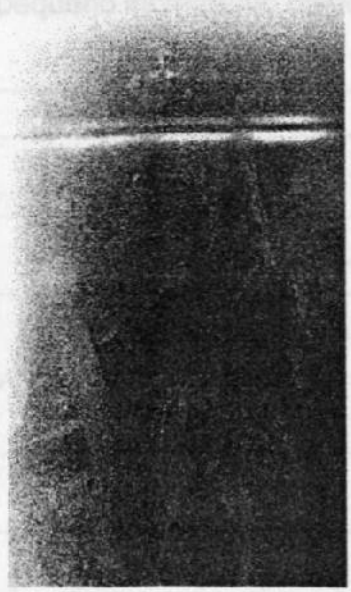


Figura 4.5.- Gel de electroforesis en condiciones nativas. Incubado en hemoglobina a pH 3.0, mostrando la banda de actividad proteolítica ácida en el tracto digestivo de larvas de catán de 5 a 8 DDE de izquierda a derecha.

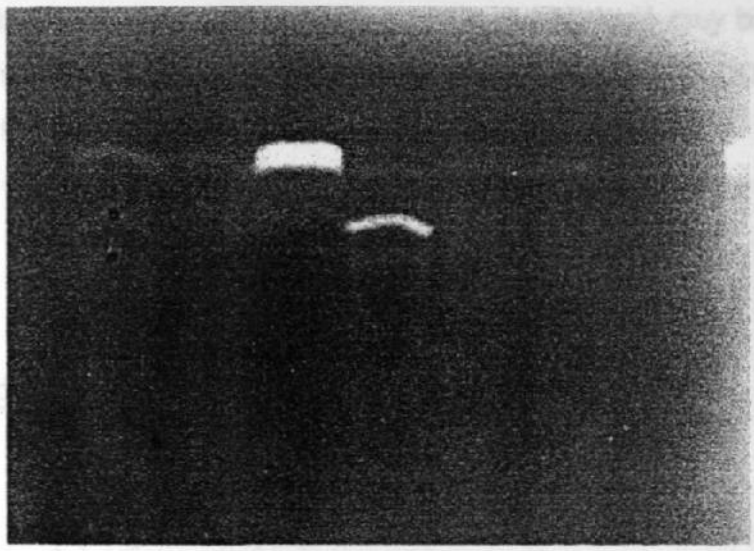


Figura 4.4.- Gel de electroforesis SDS-PAGE incubado con caseína al 1% a pH 9.0, mostrando el efecto de inhibidor PMSF (carriles de la derecha) sobre extractos de tracto digestivo de larvas de catán.

4.3.3 ACTIVIDAD PROTEOLITICA ESPECIFICA

Se detectó actividad de tipo tripsina a partir del tercer DDE. Esta se fue incrementando hasta un pico máximo en el octavo día, el cual disminuye en el 9 DDE y tiende a estabilizarse con un pequeño incremento diario (Figura 4.7).

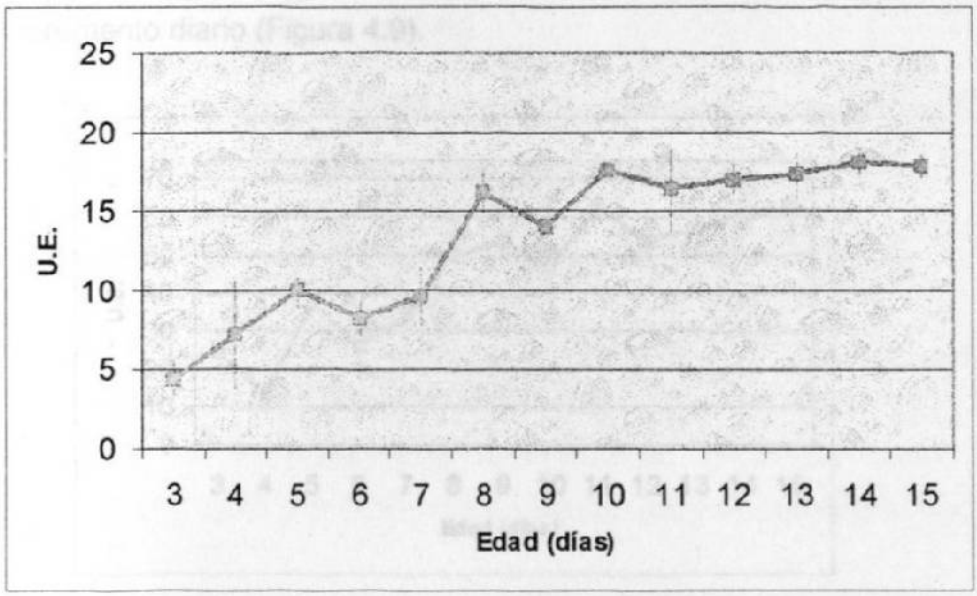


Figura 4.7.- Actividad de tipo tripsina detectada en larvas de catan mediante el uso de BAPNA en buffer Tris-HCl pH 8.4

La actividad de tipo quimotripsina detectada permaneció muy baja del 3 DDE al 5 DDE, posteriormente se incrementó con un máximo en el 8 DDE y tendiendo a estabilizarse en lo sucesivo con algunas variaciones (Figura 4.8).

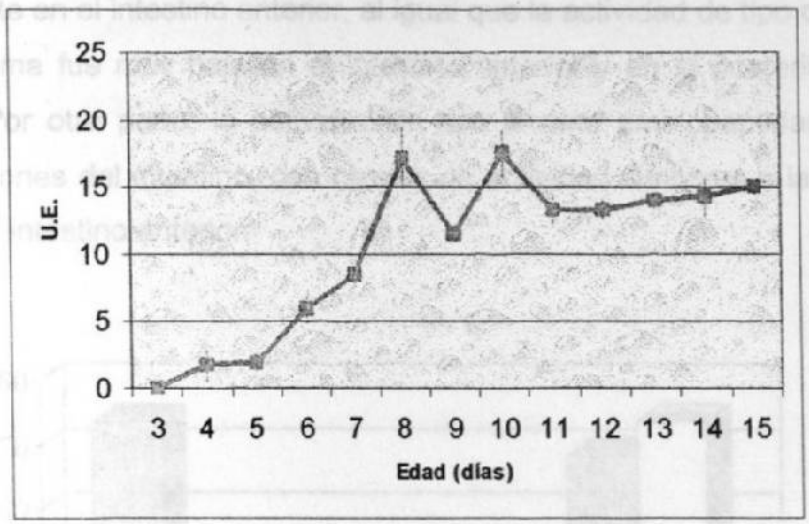


Figura 4.8.- Actividad de tipo quimotripsina en larvas de catán. Sustrato GPNA en buffer Tris-HCl pH 8.4.

La actividad de tipo leucina aminopeptidasa fue la que registro una mayor magnitud entre estos tres tipos de proteasas. Esta presentó un tendencia a incrementarse con un máximo en el 11 DDE y posteriormente tendió a estabilizarse con un ligero incremento diario (Figura 4.9).

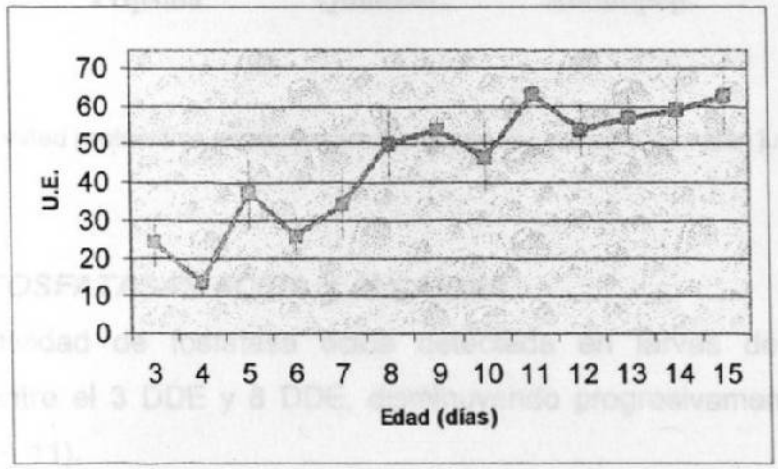
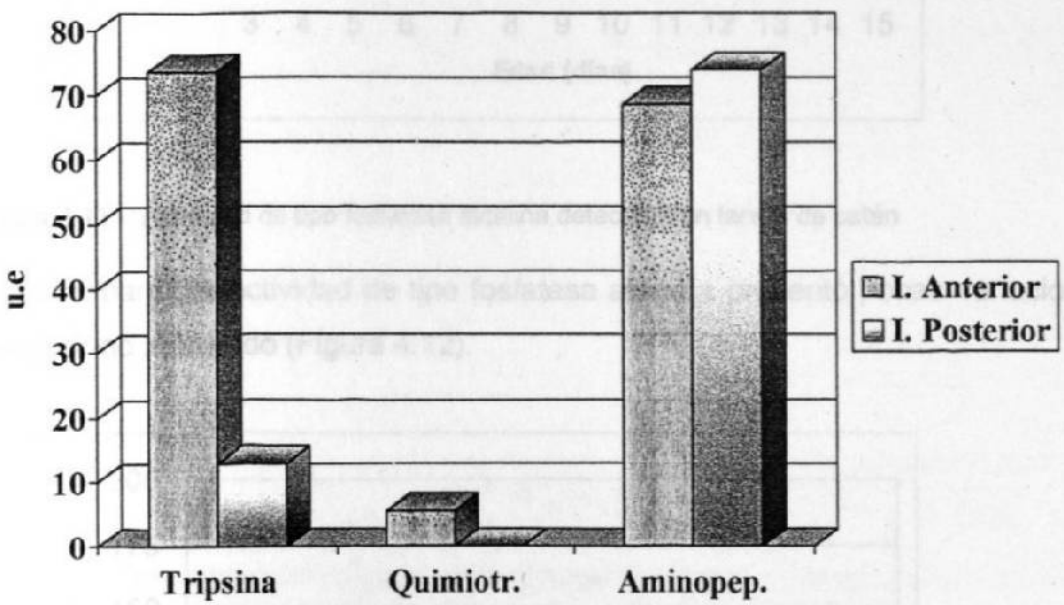


Figura 4.9.- Actividad de tipo leucina aminopeptidasa determinada en larvas de catán utilizando LNA en buffer Tris-HCl pH 8.4.

Actividad proteolítica especifica en juvenil: Estas actividades fueron detectadas en extractos de intestino de un juvenil de catán de cuatro meses de edad. Como se puede observar en la Figura 4.10, la actividad de tipo tripsina fue detectada principalmente en el intestino anterior, al igual que la actividad de tipo quimotripsina solo que esta última fue muy baja en el intestino anterior y en el posterior no fue posible detectarla. Por otra parte, la actividad de tipo leucina aminopeptidasa se detectó en ambas secciones del intestino, con niveles de actividad similares a la actividad de tipo tripsina en el intestino anterior.



10.- Actividad proteolítica especifica en secciones del intestino de catán juvenil.

4.3.4 FOSFATASAS ACIDA Y ALCALINA

La actividad de fosfatasa acida detectada en larvas de catán presentó variaciones entre el 3 DDE y 8 DDE, disminuyendo progresivamente a partir de esta edad (Figura 4.11).

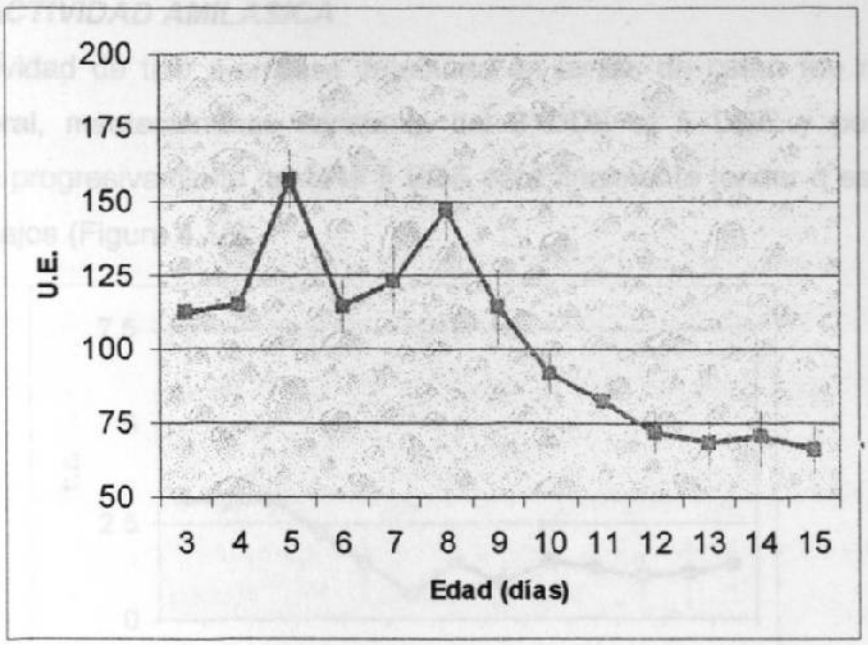


Figura 4.11.- Actividad de tipo fosfatasa alcalina detectada en larvas de catán

Por otra parte, la actividad de tipo fosfatasa alcalina presentó pocas variaciones durante el periodo analizado (Figura 4.12).

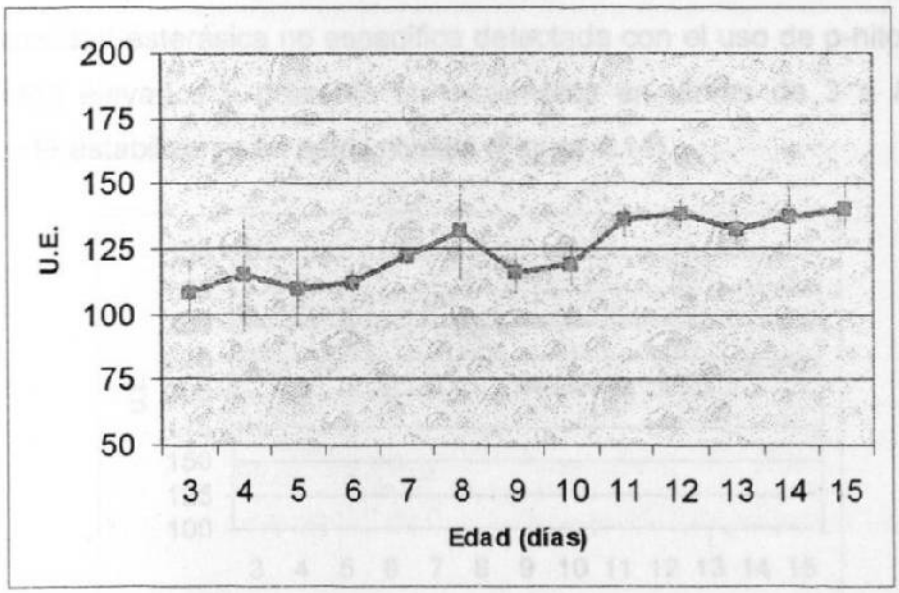


Figura 4.12.- Actividad de tipo fosfatasa alcalina de larvas de catán.

4.3.5 ACTIVIDAD AMILASICA

La actividad de tipo a-amilasa detectada en larvas de catán fue muy baja de manera general, manteniéndose constante del 3 DDE al 5 DDE y posteriormente disminuyendo progresivamente hasta el 8 DDE para finalmente tender a estabilizarse a niveles muy bajos (Figura 4.13).

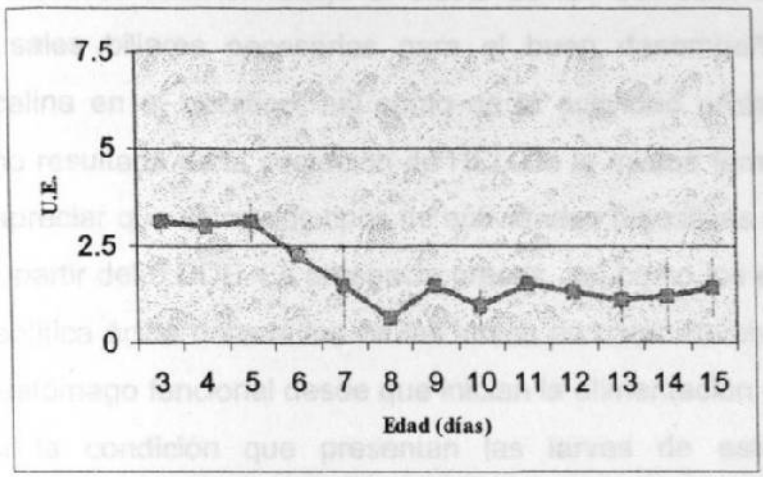


Figura 4.13.- Actividad α-amilásica detectada en larvas de catán utilizando almidón al 1% como sustrato en buffer de fosfatos de sodio pH 6.9.

4.3.6 ACTIVIDAD ESTERASICA

La actividad esterásica no específica detectada con el uso de p-nitofenil acetato, mostró niveles elevados y presentó un incremento en larvas de 3 a 8 DDE, para posteriormente estabilizarse en estos niveles (Figura 4.14).

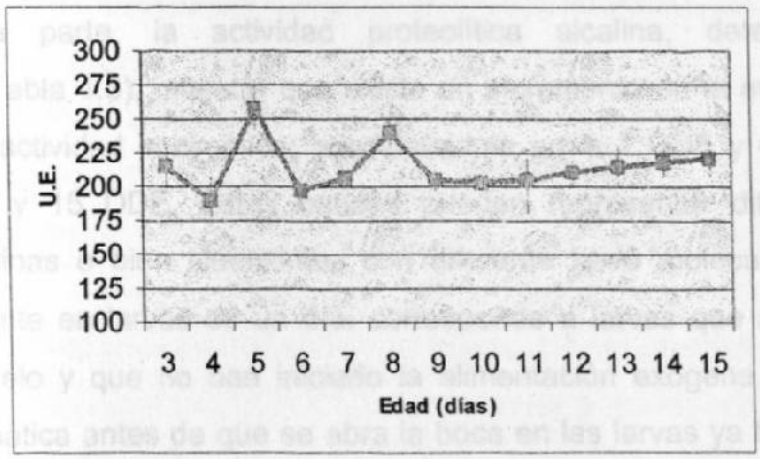


Figura 4.14.- Actividad esterásica no especificas detectada en el tracto digestivo de larvas de catán.

4.4 DISCUSION

4.4.1 ACTIVIDAD PROTEOLITICA TOTAL

El efecto del pH sobre la actividad proteolítica total mostró la misma tendencia tanto en larvas de 5 DDE como en las de 8 DDE, con dos picos de actividad a pH 2.2 y 8.4 bien marcados. Lo anterior refleja el efecto de las secreciones pancreáticas de carbonatos y sales biliares necesarias para el buen desempeño de la actividad proteolítica alcalina en el intestino, así como de la actividad proteolítica ácida en el estómago como resultado de la secreción de HCl. De la misma forma en las Figuras 2 y 3 se puede apreciar que estos dos tipos de actividades digestivas se encuentran bien establecidas a partir del 5 DDE. La presencia precoz, así como los elevados niveles de actividad proteolítica ácida detectados en las larvas de catán revelan que estos peces presentan un estómago funcional desde que inician la alimentación exógena, lo cual es equiparable a la condición que presentan las larvas de esturiones y algunos salmónidos (Budington, 1985; Budington y Doroshov, 1986; Gawlicka *et al.* 1995). En contraste, en aquellas especies cuyas larvas no presentan secreción de pepsina desde el inicio de la alimentación exógena, sólo se observa un pico de actividad a pH alcalino en larvas jóvenes y no es sino hasta que el estómago esta formado cuando aparece el pico de actividad a pH ácido (Clark *et al.*, 1986; Munilla y Stark, 1989; Moyano *et al.*, 1996; Lazo, 1999).

Por otra parte, la actividad proteolítica alcalina, detectada mediante electroforesis (Tabla 4.3), muestra que existe un incremento en el número de bandas que presentan actividad enzimática, principalmente entre 1 DDE y 4 DDE, así como entre 10 DDE y 15 DDE. Estas bandas pueden representar diferentes tipos de proteasas alcalinas o bien isoenzimas con diferente peso molecular. La banda de actividad presente en larvas de un dia, corresponde a larvas que aún dependen de reservas de vitelo y que no han iniciado la alimentación exógena. La detección de actividad enzimática antes de que se abra la boca en las larvas ya ha sido observada en varias especies de peces siendo resaltada esta característica por Moyano *et al.*

(1996). Por otra parte, la mayoría de las bandas están presentes para el 5 DDE, cuando inicia la alimentación exógena, permaneciendo este patrón de bandas estable durante varios días y no es sino hasta el 15 DDE cuando aparecen dos bandas adicionales con actividad. Sin embargo, estas dos ultimas bandas no necesariamente representan otras enzimas, pudiendo representar isoezimas que aparecen en este estadio (Dabrowski, 1996) o bien un efecto de la alta concentración de enzimas en el extracto, ya que cuando una enzima es aplicada en concentraciones elevadas en el gel de electroforesis esta puede revelarse en varias bandas (Moyano *et al.*, 1996). Por lo anterior, es probable que las diferentes proteasas alcalinas estén presentes desde el inicio de la alimentación exógena, de la misma forma en que se ha observado en otras larvas de peces (Alliot *et al.*, 1977; Lauff y Hofer, 1984; Buddington, 1985; Ueberschar, 1985; Person-Le Ruyet, 1989; Dabrowski y Culver, 1991; Moyano *et al.*, 1996).

Otro aspecto remarcable que se puede observar en la Tabla 4.5, es que la mayoría de las proteasas alcalinas se encuentran en la parte anterior, lo cual puede ser explicado debido al hecho de que en esta sección ademas de las enzimas producidas por el epitelio intestinal se encuentran las enzimas producidas por el páncreas.

Todas aquellas bandas con actividad proteolítica alcalina lograron ser inhibidas por el SBTI, el cual es un inhibidor de serina proteasas. El PMSF, también un inhibidor de serina proteasas, produjo inhibición total en dos bandas (26.8 y 33.7 kD) e inhibición parcial en otra (18.8 kD) . El patrón de inhibición anterior se presentó también al utilizar el TLCK, el cual es un inhibidor más especifico de serina proteasas actuando particularmente sobre la actividad de tipo tripsina. En base a lo anterior, es posible considerar que la actividad proteolítica alcalina en larvas de catán esta dada principalmente por enzimas de tipo serina proteasas. A este propósito, a pesar de que comúnmente se reportan actividades de tipo tripsina y quimotripsina en larvas de peces (Moyano *et al.*, 1996), estas presentaron niveles de actividad relativamente bajos, tanto en larvas como juveniles de catán con respecto a la actividad de tipo

leucina aminopeptidasa registrada (Figuras 4.9 y 4.10). La inhibición por el EDTA sobre una de las bandas es indicativa de actividades de tipo aminopeptidasa y carboxipeptidasa como se ha venido reportando en diferentes especies.

Igualmente, mediante la técnica de SDS-PAGE fue posible comprobar la presencia de actividad proteolítica ácida desde los primeros días de alimentación exógena. Esta actividad fue inhibida por la pepstatina, sustancia que actúa como inhibidor de proteasas aspárticas, lo que confirma la existencia de actividad de pepsina desde el inicio de la alimentación exógena.

Esta tipo de técnicas proporcionan un indicio del tipo de enzimas presentes en los extractos, sin embargo una caracterización mas clara del tipo de actividad requiere su purificación, lo cual se encuentra en proceso actualmente mediante la técnica de cromatografía en gel y de intercambio ionico.

4.3.3 ACTIVIDAD PROTEOLITICA ESPECIFICA

La actividades de tipo tripsina, quimotripsina y leucina aminopeptidasa, detectadas mediante la utilización de sustratos específicos sintéticos, presentaron un incremento progresivo hasta aproximadamente 8 DDE y posteriormente tendieron a estabilizarse. Este patrón de incremento de actividad con la edad ha sido frecuentemente reportado para la mayoría de las larvas de peces estudiadas. Sin embargo, en aquellas especies que no tienen el estómago desarrollado al momento de iniciar la alimentación exógena, estas actividades intestinales presentan una ligera disminución al momento en que aparece la actividad proteolítica ácida. Por lo cual ha sido sugerido que esta disminución es producida por efecto de un relevo en el nivel de importancia entre estos tipos de digestión (Budington, 1985; Zambonino y Cahu, 1994). Como se puede observar esto no ocurre en las larvas de catán, ya que la actividad proteolítica ácida y alcalina están presentes desde que inicia la alimentación exógena.

En la Figura 4.10 se puede apreciar la importancia relativa de estos tres tipos de actividad con respecto a la sección del tracto digestivo. En primer término se aprecia que la tripsina y la quimotripsina en menor medida, actúan principalmente en la sección anterior. Mientras que en la parte posterior del intestino predomina la actividad de tipo leucina aminopeptidasa lo cual viene a confirmar que la banda de 33.7 kD representa en realidad este tipo de actividad, ya que este tipo de enzimas se producen en el epitelio intestinal y actúan a nivel de las microvellosidades complementando la digestión protéica. Esta gran actividad proteolítica a nivel del intestino posterior del catán, puede explicarse ya que en esta región se presenta una válvula espiral, la cual incrementa considerablemente la superficie del intestino. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta que estas determinaciones fueron realizadas con un juvenil de catán, por lo cual la extrapolación al funcionamiento digestivo de las larvas debe hacerse con reservas, ya que por ejemplo en larvas de esturiones la actividad enzimática se centra en la región posterior mientras que en los juveniles se registra mayor actividad en el intestino anterior (Budington, 1985; Buddington y Doroshov, 1986; Gawlicka *et al.*, 1995).

4.3.4 FOSFATASAS ACIDAS Y ALCALINAS

Las fosfatasas ácidas y alcalinas son enzimas típicamente intestinales. La fosfatasa ácida esta relacionada principalmente con la digestión intracelular en los enterocitos, mientras que la fosfatasa alcalina actúa a nivel de membrana y esta relacionada con los procesos de absorción y transporte de nutrientes. En la presente investigación se puedo observar que los niveles de fosfatasas ácidas observados en larvas de catán en general se mantuvieron altos hasta el octavo día y posteriormente tendieron a disminuir y estabilizarse. En ciertas larvas de peces han sido detectados altos niveles de esta enzima antes de que aparezca la actividad ácida en el estómago, lo que sugiere que esta actividad, en conjunto con la de las catepsinas y aminopeptidasas, representa un mecanismo compensatorio ante la ausencia de digestión extracelular (Moyano *et al.*, 1996). Sin embargo, ya que en el catán la actividad ácida se presenta desde la primera ingestión de alimento, la variación

observada podría más bien estar relacionada con el proceso de asimilación de las reservas de vitelo, puesto que la disminución de la actividad ocurre justo en el momento en que se agota el vitelo (8 DDE).

Por otra parte, los niveles de fosfatasas alcalinas encontrados en las larvas de catán presentaron pocas variaciones, aunque puede observarse una ligera tendencia a incrementarse con el tiempo. Esto puede ser indicativo de una capacidad de absorción de nutrientes necesaria en el momento en que inicia la ingestión de alimento. Mientras que el incremento gradual puede estar relacionado con el proceso de maduración de los enterocitos. El nivel en el que actúan las fosfatasas ácida y alcalina ha sido sugerido como un indicador de la madurez del intestino, asi como de la condición nutricional (Kumar y Chase, 1971; Pathak et al., 1982; Zambonino y Cahu, 1993; Moyano *et al.*, 1996; Cahu y Zambonino, 1997).

4.3.5 ACTIVIDAD AMILASICA

En general la actividad amilásica detectada en larvas de catán fue muy baja. Esto puede deberse a los hábitos carnívoros del catán. En relación con esto se ha observado que los peces con hábitos herbívoros y omnívoros requieren de niveles mas elevados de actividad amilásica con respecto a los peces carnívoros (Vonk y Westem, 1984; Munilla y Saborido, 1996). Igualmente, se ha observado que los niveles de actividad amilásica pueden ser influenciados por la dieta, incrementandose, hasta cierto limite, al aumentar los niveles de carbohidratos en el alimento (Peres *et al.*, 1996), de aquí que al no haber existido este tipo estimulo considerando los niveles de carbohidratos presentes en el alimento suministrado (nauplios de *Artemia*), se hayan presentado niveles apenas perceptibles. Un patrón muy similar en el nivel de actividad de las amilasas ha sido reportado para larvas de *Dicentrarchus labrax* (Zambonino y Cahu, 1994).

4.3.6 ACTIVIDAD ESTERASICA

Por otra parte, la actividad esterásica encontrada en larvas de catán tiende a permanecer estable durante el periodo estudiado, presentando únicamente dos picos superiores al 5 DDE y 8 DDE, al igual que la fosfatasa ácida. Lo cual sugiere también una posible participación con la absorción del vitelo. De la misma forma que las amilasas estas enzimas tienen poca participación en la digestión de las larvas de peces ya que ha sido estimado que las enzimas lipolíticas solo representan el 6.5 % de las enzimas digestivas durante el desarrollo larvario (Ozkizilcik *et al.*, 1996).

Finalmente, en función de estos resultados es posible estimar que la capacidad digestiva de las larvas del catán es muy completa desde el momento en que inicia la alimentación exógena, presentandose un incremento sostenido en la actividad con el tiempo. Por lo cual es altamente probable que su capacidad digestiva no represente una limitante para que las larvas puedan utilizar dietas artificiales. Al mismo tiempo, considerando que la actividad proteolítica ácida del estómago se encuentra desde que inician la ingestión de alimento, es probable que las larvas de catán puedan ser acondicionadas al consumo de dietas artificiales desde la primera alimentación de la misma forma que se ha venido realizando en los salmónidos y esturiones (Dabrowski *et al.*, 1985).

CAPITULO 5: EFECTO DE LAS HORMONAS TIROIDIANAS Y CORTICOSTEROIDES SOBRE EL DESARROLLO LARVARIO DEL CATAN

5.1 ANTECEDENTES

5.1.1 IMPORTANCIA Y PAPEL DE LAS HORMONAS TIROIDIANAS

La glándula tiroides es un órgano que ha sido implicado en la regulación de procesos fisiológicos en distintos vertebrados, debido en gran parte a la estimulación y liberación de dos principales hormonas: la L-tiroxina (T_4) y la 3,5,3´triiodo-L-tironina (T_3). (Figura 5.1).

Hormonas Circulantes:

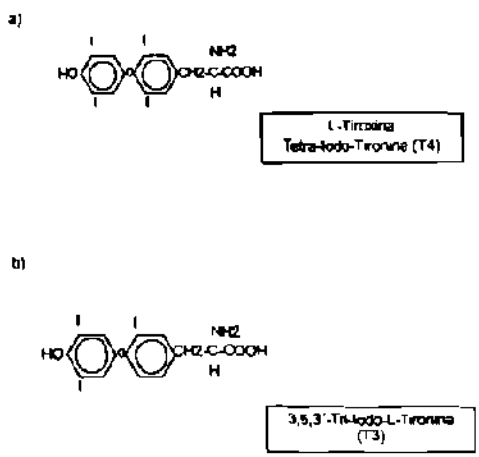


Figura 5.1.- Estructura de las hormonas tiroidianas. a) L-Tiroxina (T_4), b) 3,5,3'-Triiodo-L-Tironina (T_3).

Este sistema existe en todos los vertebrados, pero a diferencia de los mamíferos, la glándula tiroides en los peces y en particular en los salmónidos no está encapsulada y consiste en pequeños sáculos compuestos de tejido coloide dispersos en todo el organismo. En efecto, estos folículos se pueden encontrar a lo largo de la aorta ventral, en los arcos branquiales y a veces en el riñón mismo, el corazón y el ojo (Boeuf, 1987).

Se ha reportado que fisiológicamente la liberación puntual de la T_4 está propiciada por la hormona estimulante de la tiroides (TSH), pero esta última no estimula la liberación de la T_3 desde la tiroides, desconociéndose su origen dentro del estado tiroidiano. Sin embargo, se ha comprobado que existe una conversión extratiroidal de T_4 a T_3, que depende de la actividad de la enzima 5´monodesiodinasa. Esta enzima se encuentra presente en los microsomas de varios tejidos, y su actividad varía de acuerdo a la especie. La conversión de T_4 en T_3 representa una activación y un regulador potencial del estado tiroidiano periférico, que puede ser aumentado por la testosterona y la hormona de crecimiento, mientras que se reduce bajo la influencia del estradiol.

Se ha reportado que la posible regulación del estado tiroidiano, se debe a una alteración en la abundancia o en la afinidad de los receptores nucleares de la T_3 durante la metamorfosis, en el hígado de peces teleosteos, anfibios y reptiles. Sin embargo, el estado tiroidiano periférico no reposa exclusivamente sobre la regulación del receptor. En efecto, el control de este estado es ejercido igualmente por la modificación del transporte de hormonas tiroidianas del plasma a los tejidos y por la actividad de la enzima 5´monodesiodinasa (Figura 5.2).

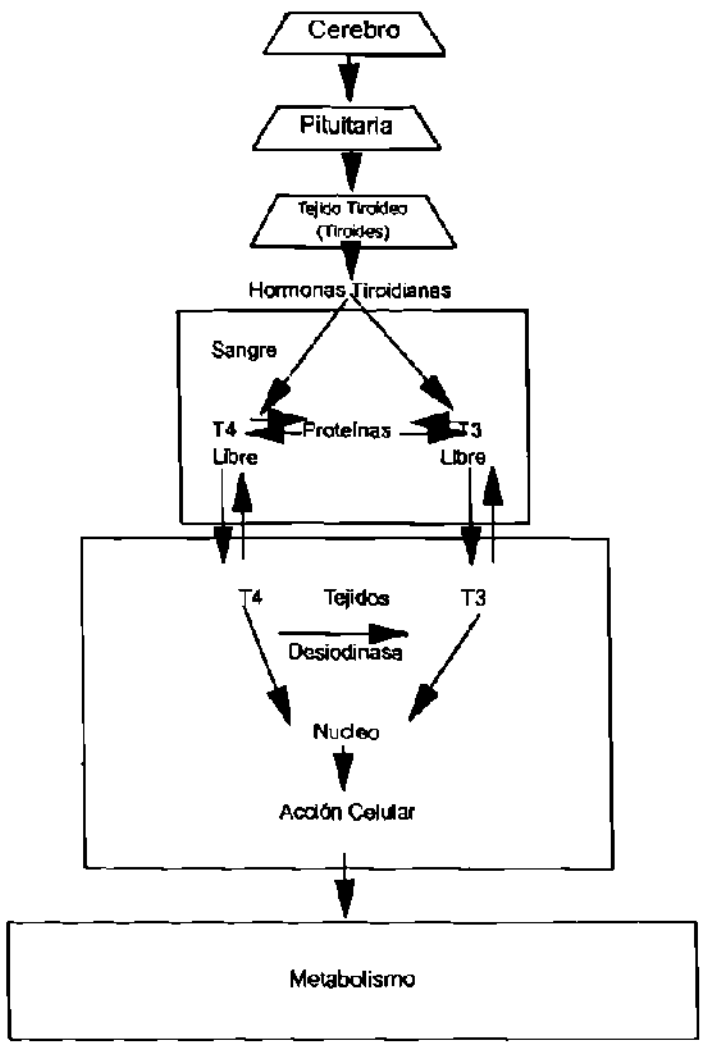


Figura 5.2.- Esquema de la regulación fisiológica para el estado tiroidiano.

El papel de las hormonas tiroidianas es determinante en la regulación del metabolismo, ya que bajo su influencia aumenta la capacidad energética aeróbia, así como la estimulación de la velocidad estándar metabólica. Durante el crecimiento, las hormonas tiroidianas y en particular la T_3, incrementan la estimulación del apetito y la tasa de conversión alimenticia. Por otra parte, durante la maduración gonadal, estas hormonas aumentan los efectos de la gonadotropina sobre la función temprana del ovario y en la maduración tardía del mismo. Por último, tienen una marcada influencia durante la metamorfosis de los peces comprendida dentro del proceso de smoltificación, la translocación de los ojos, y la inducción de otros cambios bioquímicos y mortológicos (Eales , 1990). Igualmente, ha sido observado que el tratamiento con hormonas tiroidianas en dosis apropiadas puede inducir el desove prematuro, la estimulación de la absorción del vitelo y la diferenciación morfológica, particularmente de piel, esqueleto, escamas y aletas. En contraste, el tratamiento con agentes antitiroidianos da como resultado la inducción de estasis metamórfica en peces obteniendose así larvas pelágicas gigantes (Sullivan, 1987).

Relación de Hormonas Tiroidianas con otras hormonas durante el crecimiento: De manera complementaria, la existencia de otras hormonas tales como el cortisol, estradiol y testosterona, en conjunto con las hormonas tiroidianas, pueden influir sobre diversos procesos fisiológicos tales como: la reabsorción del saco vitelino, la eclosión de los huevecillos y la reabsorción de la aleta dorsal en la platija. Además, el cortisol contribuye a potencializar la acción estimulatoria de estas hormonas tiroidianas. (De Jesús *et al.*, 1991, 1993).

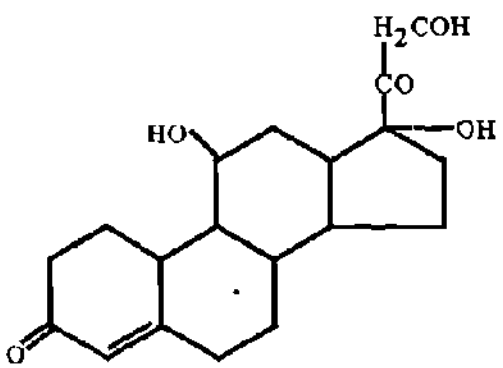
Otros autores han puesto de manifiesto el papel regulador de hormonas tiroidianas por neuropéptidos tales como la TSH. En relación con esto Inui *et al* (1989), experimentaron con hormonas heterólogas para elucidar su influencia sobre la concentración de las hormonas tiroidianas nativas. Así demostraron que era posible provocar un aumento en las concentraciones de T_4 por medio de la bTSH, permitiendo además el mantenimiento basal de los niveles de T_3 durante todo el periodo de la

metamorfosis. Adicionalmente, se constató que, la bTSH era capaz de acelerar el clímax metamórfico, así como la activación del tejido interrenal, (De Jesús *et al.*, 1991).

MacLatchy *et al.* (1990) encontraron que en la trucha rayada *(Salmo gairdneri)* se producía una estimulación y aumento de la velocidad máxima enzimática (*Vmax*) de la 5´monodesiodinasa por medio de la hormona de crecimiento humano (hGH), lo que a su vez provocaba un aumento en la conversión de T_4 a T_3 y un incremento en los niveles de T_3 en el plasma. Otros factores que repercuten sobre la actividad de la enzima 5´monodesiodinasa para la conversión de T_4 a T_3 son la temperatura, la salinidad, los niveles de cortisol y la ingesta calórica (Eales, 1990).

5.1.2 IMPORTANCIA Y PAPEL DEL CORTISOL

Los corticosteroides son producidos principalmente por la corteza adrenal o sus homólogos, que en peces esta representada por la glándula interrenal. Estos compuestos, dentro de los cuales destaca el cortisol (Figura 5.3), tienen una variedad de funciones relacionadas con el mantenimiento de los procesos normales del organismo, tales como la regulación del metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos, sin llegar a tener efectos anabólicos significativos.



CORTISOL

Figura 5.3.- Estructura del Cortisol.

Relación del Cortisol con otras Hormonas: Existe información que sugiere la importancia de las hormonas tiroidianas y/o los glucocorticoides en la secreción de la hormona del crecimiento (GH). De esta manera, la regulación de la hormona de crecimiento en vertebrados menores podría ser equivalente a evaluar la interacción entre las hormonas tiroidianas y/o glucocorticoides y el factor de la liberación de la hormona de crecimiento (GHRH) en la secreción de la hormona de crecimiento (Luo *et al.*, 1991).

En estudios previos se demostró que el cortisol, la principal hormona de este tipo en teleosteos, eleva la acción estimulatoria de las hormonas tiroidianas la que a su vez tiene un efecto directo en la reabsorción de los radios de la aleta en la platija (*Paralichthys olivaceus*) (De Jesús *et al.*, 1991). Igualmente, se ha observado cierto sinergismo entre el cortisol y las hormonas tiroidianas, que induce cambios tempranos en el desarrollo y la metamorfosis de la platija (De Jesús *et al.*, 1993).

5.1.3 EFECTO DE LAS HORMONAS TIROIDIANAS EN PECES

Los diferentes patrones de desarrollo que presentan los peces teleosteos están definidos por diversos factores, entre los cuales se encuentran: el nivel evolutivo del grupo, el tamaño, la cantidad de huevos producidos, los hábitos alimenticios, las reservas de vitelo en el huevo y las adaptaciones que presenta la especie al medio y al alimento. De estos aspectos dependerá la presencia y acción de las hormonas tiroidianas.

Metamorfosis: Los efectos de las hormonas tiroidianas sobre la metamorfosis de los anfibios dirigió la atención de los endocrinólogos comparativos para explicar su posible participación en la metamorfosis de los peces (Miwa *et al.*, 1987). De esta manera, se comprobó que mediante la administración exógena de las hormonas tiroidianas se inducía la metamorfosis prematura de las larvas, mientras que un tratamiento con goitrógenos contrarrestaba este proceso.

A título de ejemplo se puede señalar que mediante la adición de la Tiroxina (T_4) era posible acelerar la metamorfosis de larvas de platija (*Paralichtys olivaceus*), las cuales alcanzaban precozmente el tamaño característico de los juveniles en un lapso reducido de tiempo (Inui *et al.*, 1985). Así mismo, se logró comprobar que la Tiourea inducía estasis metamórfica, dando como resultado larvas pelágicas gigantes.

Dentro de los efectos más marcados, relacionados con los cambios morfológicos durante la metamorfosis, se encuentran la translocación de los ojos y reabsorción de los radios de la aleta dorsal durante el desarrollo de la platija (*P. olivaceus*), bajo la influencia de la Tiroxina (T_4) y Triiodotironina (T_3) (Miwa *et al.*, 1987 y 1988). La reabsorción de los radios de la aleta se produce durante el clímax metamórfico al aumentar los niveles naturales de las hormonas tiroidianas, esto dio lugar a la utilización de ambas hormonas, T_3 y T_4, en otros peces con el fin de estimular el acortamiento de los radios (De Jesús *et al.*, 1993).

Metabolismo: Las hormonas tiroidianas también influyen en diversas actividades metabólicas así, Degani *et al.* (1989) reportaron que la T_3 añadida en la dieta de la Anguila europea (*Anguilla anguilla*) incrementaba su capacidad de consumo de oxígeno. Mientras que a diferentes concentraciones de esta hormona en la dieta, disminuía el contenido proteico del cuerpo de la anguila e incrementaba su contenido de grasa corporal, pero sin afectar la composición de los ácidos grasos. También determinaron el efecto de la T_3 sobre el incremento en la actividad enzimática de la aldolasa, una enzima involucrada en la catálisis de la reacción de ruptura de la Fructosa 1,6-bifosfato a Dihidroxiacetona-fosfato y Gliceraldehido-3-fosfato.

Por otra parte, Hilton *et al.* (1987) observaron que la administración de la T_3 por vía oral en la trucha arco iris (*Salmo gairdneri*) incrementaba el crecimiento y la eficiencia de alimentación, lo que se reflejo en un incremento en la tasa de eficiencia proteica (PER) y de la utilización de energía en este pez. Sin embargo, la T_3

administrada no aumentó significativamente la utilización de la glucosa de la dieta como fuente de energía ni los niveles de insulina en el plasma.

Los excesos de las principales fuentes de energía pueden afectar el nivel hormonal en peces. Himick *et al* (1994) demostraron en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) cambios agudos en los niveles plasmáticos de T_3, T_4 y glucosa por la alteración de la concentración de carbohidratos, proteínas y lípidos de la dieta. Estos autores demostraron también que una dieta a base de carbohidratos solo aumentaba los niveles de T_4, mientras que los niveles de T_3 no se veían afectados.

Desarrollo y Sobrevivencia: Se ha reportado que los tratamientos con T_3 y T_4 resultan eficaces para estimular el crecimiento y la sobrevivencia en larvas de peces. La aplicación de estos tratamientos han tenido como base los cambios que se producen de manera natural en las concentraciones de cortisol y hormonas tiroidianas durante el desarrollo temprano de peces. (Tabla 5.1)

Organismo	Hormona(s)	Efecto	Autor
Robalo rayado *(Morone saxatilis)*	T_3	El inflamiento de la vejiga natatoria fue mayor en larvas tratadas con la hormona. Incremento de sobrevivencia en larvas.	Brown *et al.* (1988)
Tilapia *(Sarotherodon mossambicus)*	T_3	Aceleramiento en el desarrollo y aumento en la sobrevivencia.	Lam *et al.* (1980)
Tilapia (*Oreochromis mossambicus*)	T_3 y T_4 Feniltiocarba-mida (PTC)	Incubación de huevos fertilizados en un medio conteniendo diferentes dosis de T_3 y T_4, indicaron que estas hormonas retrasaron la eclosión, mientras que la sustancia antitiroidiana PTC aceleró este proceso	Reddy and Lam, (1991)
Rabbitfish (*Siganus guttatus*)	T_3 y T_4	Efectos benéficos en el crecimiento y desarrollo de larvas.	Ayson and Lam, (1993)
Robalo rayado (*Morone saxatilis*)	T_3 y T_4	Las altas concentraciones de T_3 en el plasma aceleraron la absorción del vitelo	Brown *et al*, (1987)

Tabla 5.1.- Efectos de las hormonas tiroidianas sobre el desarrollo y sobrevivencia de larvas.

Crecimiento de Cartilago, Hueso y Musculo: Las hormonas tiroidianas juegan un papel importante en el proceso de crecimiento de los peces. En el caso de los salmónidos y otros peces, la administración de hormonas tiroidianas implica un incremento más pronunciado en longitud que en peso, presuntamente debido a la estimulación del crecimiento esquelético. (Tabla 5.2).

Organismo(s)	Hormona(s)	Efecto(s)	Autor(es)
Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)	T_3	Estimulación del crecimiento esquelético. La T_3 es la responsable del aumento en la estimulación para el crecimiento de cartílago y hueso.	Takagi *et al* (1994)
Salmónidos (*Salmo gairdneri, Oncorhynchus kisutch, Salmo salar* y *O. tshawytscha)*	T_3 y T_4	Se ve incrementado el ancho o la altura del esqueleto debido a la hiperplasia de los elementos del tejido conectivo de la región interorbital. Además tienen influencia en la formación de hueso y cartílago, siendo más potente la T_3 que la T_4.	Higgs *et al* (1982)
Platija (*Paralichtys olivaceus*)	T_4	Influencia sobre la composición del músculo estriado en particular de la troponina T, componente involucrado en su contracción.	Yamano *et al* (1991)

Tabla 5.2.- Efecto de las hormonas tiroidianas en el crecimiento de cartilago, hueso y musculo.

Cambios en los Niveles Hormonales: La manipulación experimental de los niveles de hormonas tiroidianas, influye directamente sobre el crecimiento y desarrollo de numerosas especies de peces durante el desarrollo larvario (Kobuke *et al* 1987). Los niveles de administración se han determinado en base a la medición de los cambios en las concentraciones de hormonas tiroidianas durante el desarrollo temprano de los peces, tanto en huevos como en tejidos larvarios.

Se ha reportado que los bajos niveles de hormonas tiroidianas en embriones de salmón (*Oncorhynchus kisutch*), están relacionados con una probable disfunción en la

toma de la hormona de la sangre materna durante el período del crecimiento del ovocito (Leatherland *et al* 1989). Además, se ha determinado que los cambios en los niveles hormonales y en la incorporación de iodo, son producto de la T_4 y T_3 de origen materno. Sin embargo, después de la eclosión de la larva, esta es capaz de producir sus propias hormonas (Greenblatt *et al*, 1989).

En relación con esto, se conoce que no existe intervención de las hormonas tiroidianas durante los primeros 4 días después de la fertilización en huevos. Esto ha sido demostrado por Tagawa *et al* (1991) en estudios con el medaka (*Oryzias latipes*), quienes señalaron que debido a las bajas concentraciones de T_4 y T_3 (de 1 a 4 ng/g) durante este período de tiempo era probable que estas no fueran metabolizadas. (Figura 5.4)

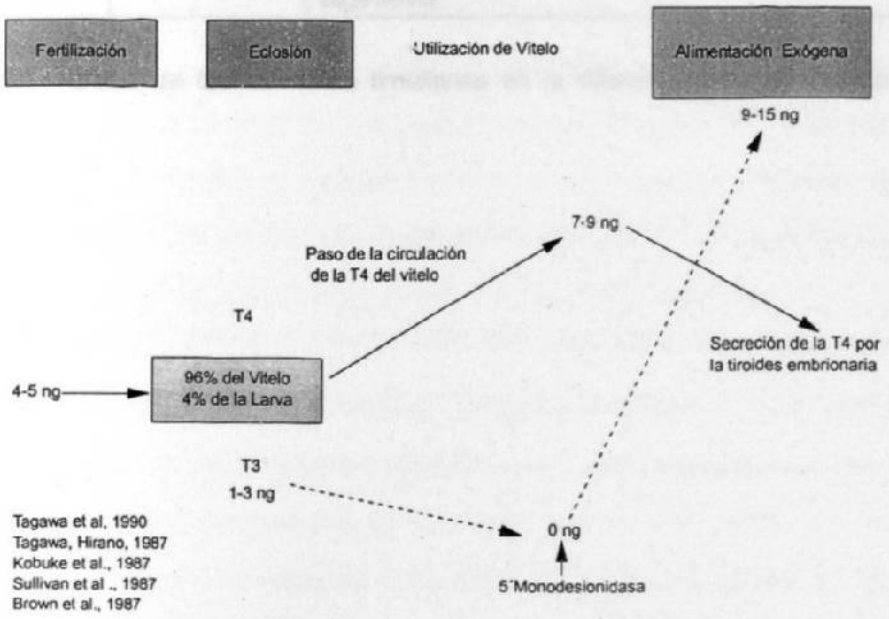


Figura 5.4.- Cambios en los niveles hormonales durante el desarrollo larval en peces.

Diferenciacion Morfologica: El tratamiento con hormonas tiroidianas en dosis apropiadas en diferentes vertebrados en desarrollo puede inducir la diferenciación morfológica, particularmente a nivel del sistema digestivo. (Tabla 5.3).

Organismo(s)	Hormona(s)	Efecto(s)	Autor(es)
Ratón	T_4	Diferenciación morfológica precoz de la mucosa del estómago.	Kumegawa *et al* 1978
Salmónidos *(Oncorhynchus keta, O. kisutch, O. tschawystcha, Salmo salar)*	T_4 y T_3	Diferenciación precoz de la pared abdominal del cuerpo.	Sullivan *et al* 1987
Robalo rayado (*Morone saxatilis*)	T_3	Aumento en el grosor de la capa muscular del estómago de larvas.	Huang *et al*, 1988.
Anfibios.	T_4	Se encontraron glándulas tubulares nuevas y el desarrollo de un revestimiento nuevo del tracto digestivo.	Pouyet *et al*, 1983.

Tabla 5.3.- Efecto de las hormonas tiroidianas en la diferenciacion morfologica de diferentes vertebrados.

5.2 METODOLOGIA

5.2.1 ORGANISMOS EXPERIMENTALES

Se obtuvieron huevos de catán, el 11 de junio de 1998, a partir de un lote de siete reproductores en el Centro Acuícola Vicente Guerrero, ubicado en Abasolo Tamps., perteneciente al Gobierno del Estado de Tamaulipas. De manera paralela se obtuvieron larvas de catán recién eclosionadas en el Centro Acuícola Tancol el 1 de Junio de 1999. Los huevos y larvas fueron transportados en bolsas de plástico con oxígeno a las instalaciones del Grupo Ecofisiología en la Fac. De Ciencias Biológicas U.A.N.L. Las larvas y huevos fueron colocados en canaletas de fibra de vidrio de 230 cm de largo, 70 cm de ancho y 30 cm de altura con un volumen de 480 L para ser incubados y/o aclimatadas en el laboratorio antes de ser distribuidas en los acuarios.

5.2.2 CONDICIONES EXPERIMENTALES

Considerando el efecto de las hormonas tiroidianas, sobre la maduración del sistema digestivo se realizó una fase experimental consistente en determinar el efecto de estas hormonas (Tiroxina y Triiodotironina), como control negativo se utilizó un agente anti-tiroidiano (Tiourea) y un tratamiento testigo en el que no se incluyeron hormonas. Adicionalmente, se probó el efecto de la Hidrocortisona.

Las hormonas puras L-Tiroxina (T_4), Triiodo-L-Tironina (T_3), Hidrocortisona (HC) y la Tiourea (TU) fueron obtenidas en SIGMA, para ser utilizadas en los bioensayos. Para la realización de los bioensayos se utilizaron acuarios de vidrio con capacidad de 45 litros de agua. En cada acuario se colocaron 30 larvas al iniciar los experimentos. La temperatura del agua fue mantenida en 27 ± 1 °C y se proporcionó aireación constante mediante un compresor para mantener los niveles de oxígeno alrededor de 6.0 ppm. Una vez que las larvas tuvieron la capacidad de ingerir alimento se les proporcionó nauplios de *Artemia* en dos raciones diarias 0.5 g para que se alimentaran *ad libitum*. La edad de las larvas al iniciar el experimento fue de 3 días después de la eclosión (DDE), por lo cual se trataba de larvas con vitelo que aún no nadaban

libremente ni ingerían alimento, lo cual ocurrió al quinto DDE. Los experimentos fueron detenidos cuando las larvas tenían 13 DDE.

Se realizaron dos bioensayos que se diferenciaron por la cantidad total de hormonas administradas. Cada tratamiento se llevó a cabo por cuadruplicado en cada uno de los bioensayos.

Primer bioensayo: Ante el desconocimiento de los niveles normales de este tipo de hormonas en los lepisosteidos se utilizaron las dosis reportadas con mayor frecuencia en otras especies de peces. Los tratamientos y las concentraciones totales de las hormonas utilizadas se presentan en la Tabla 5.4. Las hormonas fueron previamente disueltas en agua y aplicadas diariamente repitiendo la dosis inicial mediante un recambio de agua del 30 % del volumen total.

Tratamiento hormonal	*Concentración diaria*	*Concentración total*
3,3',5-triiodo-l-tironina (T_3)	0.1 ppm de T_3	0.323 ppm de T_3
L-tiroxina (T_4)	0.1 ppm de T_4	0.323 ppm de T_4
Tiourea (TU)	30 ppm de TU	97.17 ppm de TU
Hidrocortisona (HC)	0.1 ppm de HC	0.323 ppm de HC
Testigo sin hormona (T)	Testigo sin hormona	Testigo sin hormona

Tabla 5.4.- Distribución de los tratamientos y concentraciones diarias y totales aplicadas durante el primer bioensayo.

Segundo bioensayo: Debido a las elevadas mortalidades que se presentaron en el tratamiento con T_3 del primer bioensayo se decidió repetir esta etapa experimental, reduciendo la dosis total de las hormonas, sin embargo, debido a la falta de T_4 este tratamiento no fue incluido. Las hormonas fueron aplicadas en una sola dosis al iniciar el experimento y no se realizaron recambios de agua. Las hormonas fueron previamente disueltas en agua posteriores y las concentraciones totales utilizadas se presentan en la Tabla 5.5.

Tratamiento hormonal	*Concentración total*
3,3',5-triodo-l-tironina (T_3)	0.1 ppm de T_3
Tiourea (TU)	30 ppm de TU
Hidrocortisona (HC)	0.1 ppm de HC
Testigo sin hormona (T)	Testigo sin hormona

Tabla 5.5.- Distribución de los tratamientos concentraciones totales aplicadas en el segundo bioensayo.

5.2.3 EVALUACION DE LOS BIOENSAYOS

Determinación de T_3 en larvas: La preparación de las muestras para la determinación de las concentraciones de T_3 fue realizada siguiendo la metodología descrita por Kobuke *et al.* (1987) (Figura 5.5). Inicialmente, las larvas fueron homogenizadas individualmente en 2 mL de etanol frío al 95% conteniendo 6-N-Propyl-2-Thiouracil al 1 mM, utilizando un Potter Elveham. Este último compuesto fue adicionado con la finalidad de bloquear la conversión enzimática de T_4 a T_3. . El Potter fue lavado con 2 mL de etanol los cuales fueron agregados al homogenizado inicial. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 1,700 g durante 10 minutos a 4 °C. El precipitado fue nuevamente extraído con 1 ml de etanol siendo nuevamente centrifugado bajo las mismas condiciones. Los sobrenadantes fueron combinados y secados al vacío a 37 °C durante toda la noche. Finalmente, las muestras fueron reconstituidas en 0.1 mL de etanol y 0.9 mL de buffer barbital 0.11 M pH 8.6 (SIGMA B6632) y fueron enviadas al Laboratorio del Servicio de Endocrinolgía de Hospital Universitario Dr. Jose Eleuterio Gonzalez, en donde se determinaron las concentraciones de T_3 mediante un radioinmunoensayo (RIA).

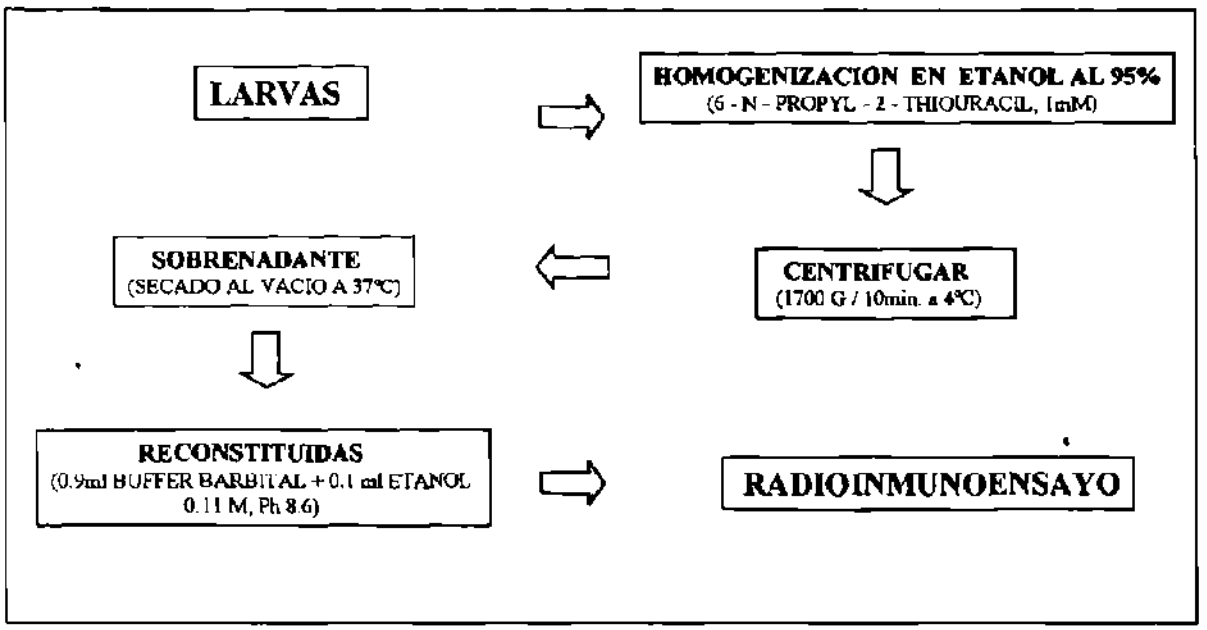


Figura 5.5 Diagrama de flujo de preparación de las muestras para determinación de T_3 de acuerdo a Kobuke *et al.* (1987).

Determinación de cortisol en larvas: El método utilizado para la determinación de las concentraciones de cortisol fue el descrito por De Jesús *et al.* (1991) (Figura 5.6). Se homogenizó un lote de 5 larvas por tratamiento en una proporción de 1:5 (peso/volumen) en buffer de fosfatos (sódico monobásico y sódico dibásico) 10 mM, salino (NaCl 140 mM) a un pH de 7.3. Una alícuota de 0.25 ml del homogenizado fue mezclada con 3 mL de dietil-éter mediante agitación vigorosa durante 1 minuto y posteriormente se separó el extracto de éter mediante congelación de la muestra a -80° C. La extracción fue repetida sobre la fase acuosa y se mezclaron los extractos de éter para posteriormente ser secado en un baño de agua a 45 °C en una atmósfera de nitrógeno. Los extractos fueron reconstituidos con 0.25 ml de PBS conteniendo gelatina al 0.1% y fueron enviados al Laboratorio del Servicio de Endocrinolgía de Hospital Universitario, en donde se determinaron las concentraciones de Hidrocortisona mediante un radioinmunoensayo (RIA).

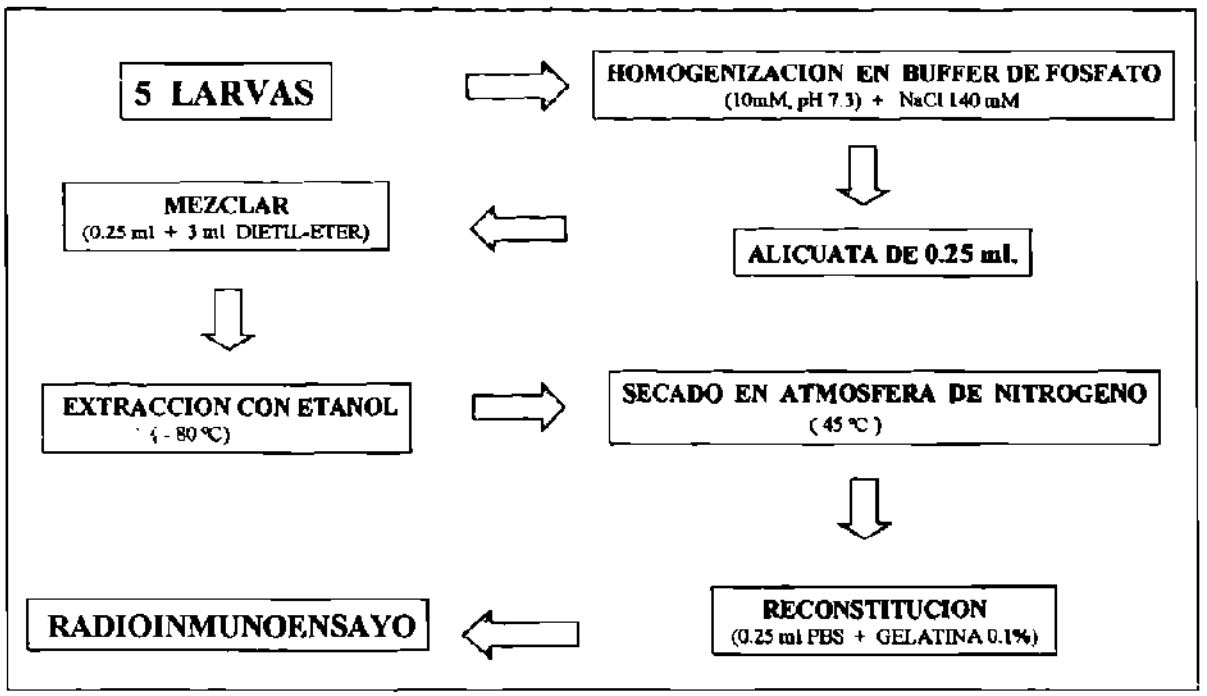


Figura 5.6 Diagrama de flujo de preparación de las muestras para determinación de cortisol de acuerdo a De Jesús *et al.* (1991).

Características Morfológicas: Al finalizar los bioensayos se contaron las larvas por acuario para determinar el porcentaje de sobrevivencia. Las larvas fueron pesadas individualmente en una balanza OHAUS con un grado de precisión de 0.1 mg y fijadas en líquido de Bouin. Se determinó la longitud total utilizando un vernier con un grado de exactitud de 0.1 mm. Adicionalmente se determinó la longitud del hocico como un indicador del grado de transformación de la larva y la altura corporal al nivel del ano (altura preanal) como indicador de la condición nutricional de las larvas. Estas dos características morfométricas fueron reportadas en porcentaje de la longitud total de acuerdo a lo descrito en el Capitulo 2.

Características Histológicas: Se realizaron cortes histológicos de tres larvas por tratamiento y se determinó la altura celular de los enterocitos del intestino anterior.

La metodología para la realización de los cortes, técnica de tinción y medición de las células corresponde a lo descrito en el Capitulo 3.

Determinación de Enzimas Digestivas: La actividad proteolítica total ácida y alcalina fue determinada en extractos de intestino de las larvas de cada tratamiento. La metodología utilizada para estas determinaciones fue realizada de la forma en que se describe el Capitulo 4.

Análisis Estadístico: Las variables consideradas y los resultados obtenidos fueron analizados por medio de un Análisis de Varianza (ANOVA) donde se determinaron las diferencias que pudieran existir entre los tratamientos. En aquellas variables que presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó la prueba de rangos múltiple de Duncan para separar grupos homogéneos entre la medias con un nivel de significancia del 0.05% (Steel y Torrie, 1980).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 *PRIMER BIOENSAYO*

5.3.1.1 CONCENTRACION DE HORMONAS

Concentración de T_3 en larvas: Los niveles basales de T_3 en huevos y larvas mantenidas sin administración de hormonas se presenta en la Figura 5.7. En esta se puede apreciar que los niveles de T_3 en huevos recién puestos y antes de eclosionar son muy bajos (0.0117 y 0.00995 ng/huevo, respectivamente, determinados a partir de un lote de 10 huevos cada uno) y permanecen constantes durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, después de la eclosión comienzan a incrementarse los niveles de T_3, y a los 10 DDE esta se eleva de manera dramática para posteriormente disminuir al 13 DDE.

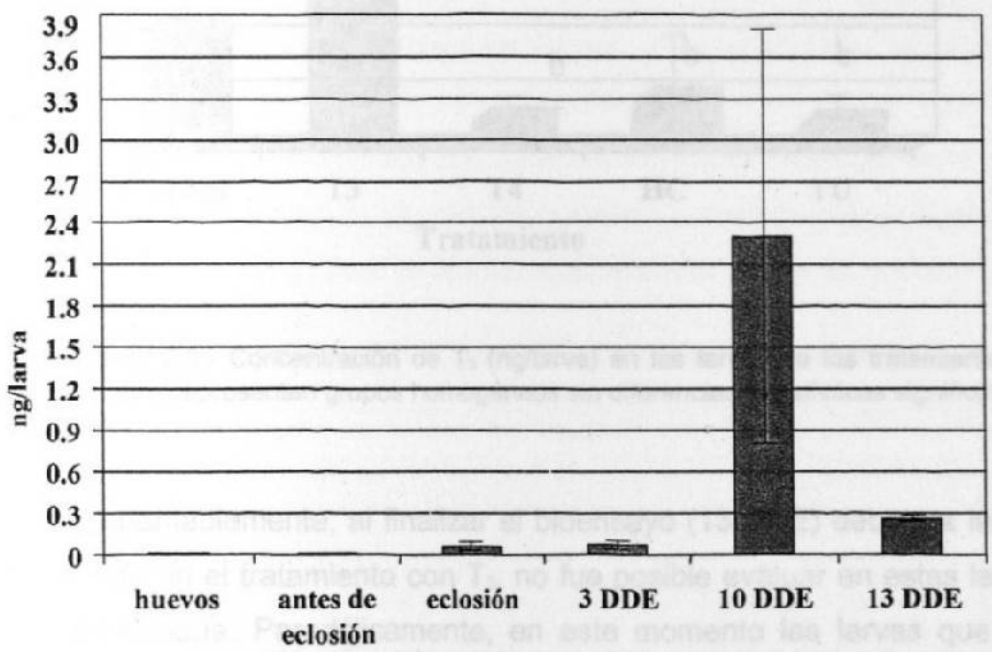


Figura 5.7 Concentraciones normales de triiodotironina (T_3) durante el desarrollo de huevos y larvas de catán.

Un muestra de 3 larvas por cada tratamiento hormonal mostró que a los 10 DDE aquellas larvas sometidas a la T_3 presentaban niveles muy elevados de esta hormona (7.8 ng/larva), presentandose diferencias significativas con los otros tratamientos (F=32.39; P=0.000; gl= 10,4) mientras que las larvas a las que no se les administró ninguna hormona presentaban niveles de T_3 de 2.22 ng/larva y las larvas sometidas a T_4, hidrocortisona y tiourea presentaron niveles menores a 1 ng/larva (Figura 5.8).

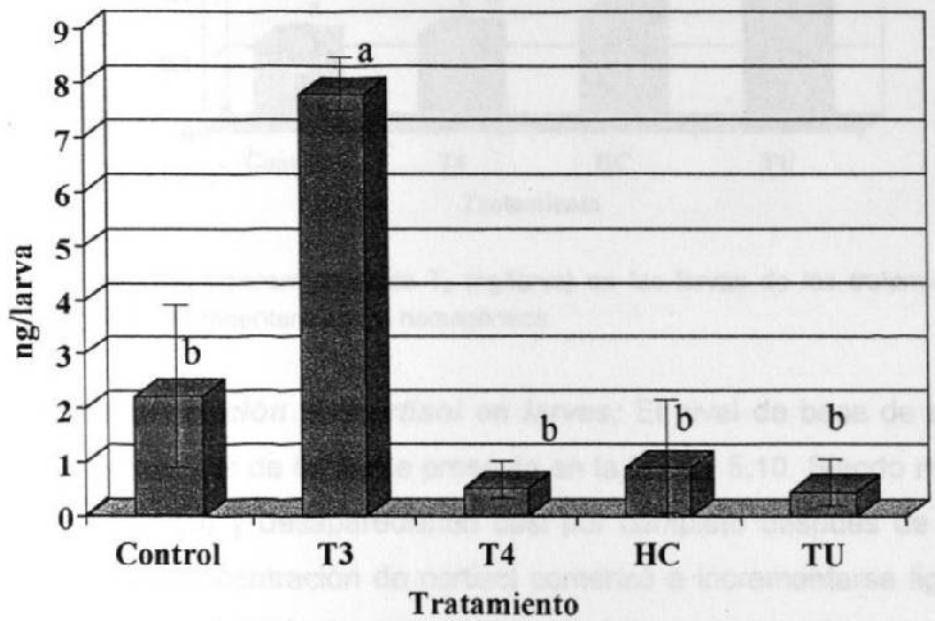


Figura 5.8.- Concentración de T_3 (ng/larva) en las larvas de los tratamientos a 10 DDE. Las literales iguales representan grupos homogéneos sin diferencias estadísticas significativas.

Lamentablemente, al finalizar el bioensayo (13 DDE) debido a la mortalidad que se presentó en el tratamiento con T_3, no fue posible evaluar en estas larvas los niveles de esta hormona. Paradójicamente, en este momento las larvas que presentaron el mayor nivel de T_3 fueron aquellas sometidas a la tiourea (0.7 ng/larva), mientras que las larvas control, las sometidas a HC y T_4 presentaron valores cercanos a 0.3 ng/larva sin presentarse diferencias significativas en los niveles de T_3 (F=1.04; P=0.424; gl= 8,3) (Figura 5.9).

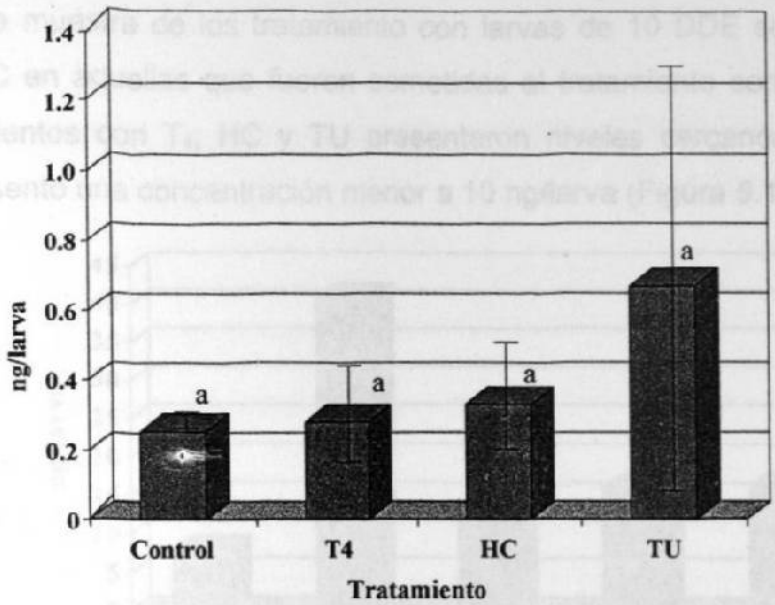


Figura 5.9 Concentración de T_3 (ng/larva) en las larvas de los tratamientos a 13 DDE. Las literales iguales representan grupos homogéneos.

Concentración de cortisol en larvas: El nivel de base de cortisol encontrado en huevos y larvas de catán se presenta en la Figura 5.10. Siendo muy bajo en huevos (0.121 ng/huevo) y desapareciendo casi por completo después de la eclosión (0.004 ng/larva). La concentración de cortisol comenzó a incrementarse ligeramente hasta el 10 DDE (8.05 ng/larva), para posteriormente incrementarse de manera importante a los 13 DDE (66.6 ng/larva).

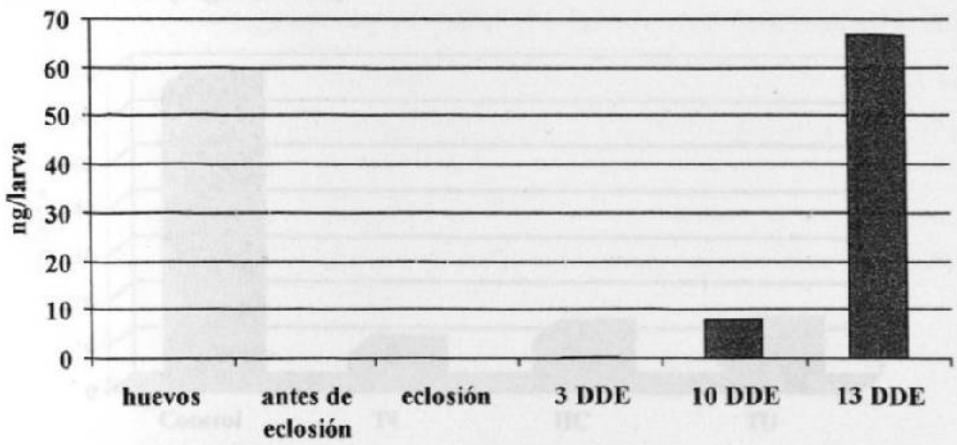


Figura 5.10 Concentraciones normales de cortisol durante el desarrollo de huevos y larvas de catán.

En la muestra de los tratamiento con larvas de 10 DDE se encontró un mayor nivel de HC en aquellas que fueron sometidas al tratamiento con T_3 (40.77 ng/larva). Los tratamientos con T_4, HC y TU presentaron niveles cercanos a 15 ng/larva y el control presentó una concentración menor a 10 ng/larva (Figura 5.11).

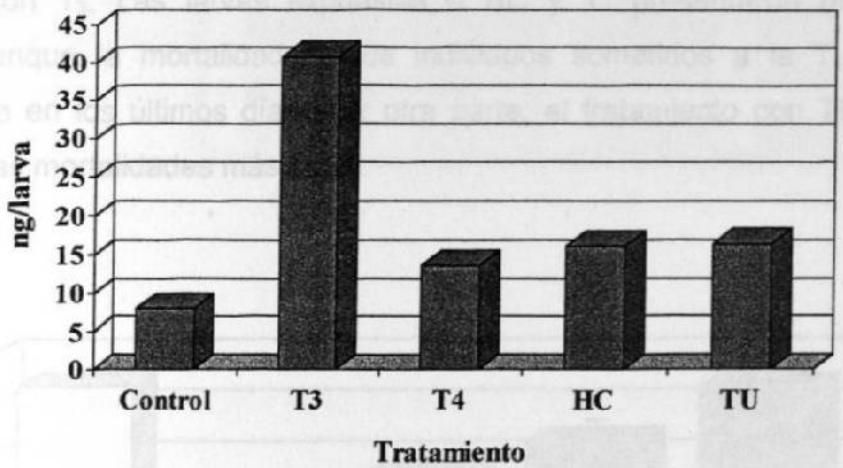


Figura 5.11 Concentración de Cortisol (ng/larva) en larvas de catán de 10 DDE sometidas a diferentes tratamientos hormonales.

Cuando las larvas alcanzaron 13 DDE el tratamiento control presentó un marcado incremento, siendo seis veces superior a los niveles encontrados en el resto de los tratamientos (T_4, HC y TU) los cuales no variaron significativamente su nivel. Por otra parte, el tratamiento con T_3 no fue analizado en este momento debido a la mortalidad mencionada (Figura 5.12).

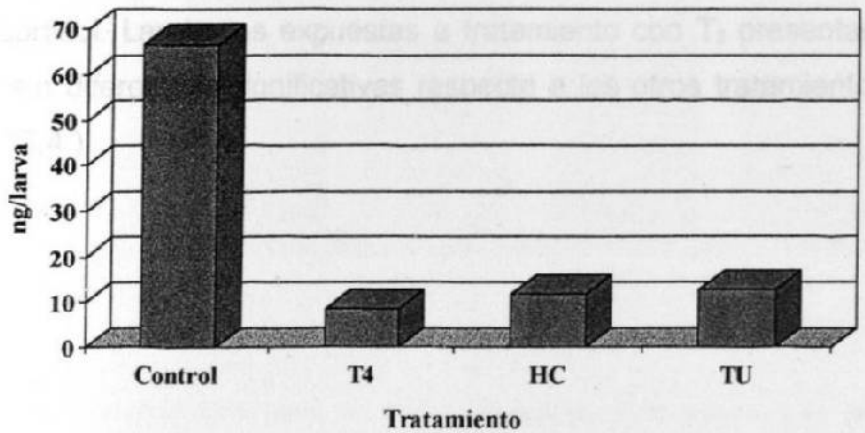


Figura 5.12 Concentración de cortisol (ng/larva) en larvas de catán de 13 DDE.