



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

**Instituto de Investigaciones
Agropecuarias y Forestales**

**Programa Institucional de Maestría en
Ciencias Biológicas**

**Efecto de la administración de Tiroxina en el
crecimiento de juveniles del Pez blanco de
Pátzcuaro *Menidia estor***

TESIS

QUE PRESENTA

Pamela Navarrete Ramírez

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Director de Tesis: Dr. Carlos Antonio Martínez Palacios

Morelia, Michoacán, agosto del 2009.



**INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS
Y FORESTALES**

ÍNDICE

1. Resumen-----	1
2. Introducción-----	3
2.1.Generalidades de las Hormonas Tiroideas-----	4
2.2.Estructura de las TH-----	5
2.3.Biosíntesis de Hormonas Tiroideas-----	6
2.4.Transporte de las Hormonas Tiroideas-----	9
2.4.1. Proteínas transportadoras en peces-----	9
2.5. Metabolismo de Hormonas Tiroideas-----	10
2.5.1. Desyodación-----	11
2.6. Mecanismos de Acción-----	13
2.6.1. Mecanismos Genómicos-----	14
2.6.2. Mecanismos no Genómicos-----	17
2.7. Efectos Biológicos de las Hormonas Tiroideas-----	17
2.7.1. Metabolismo energético-----	17
2.7.2. Efectos sobre el crecimiento-----	18
2.7.3. Efectos sobre el crecimiento y desarrollo en peces-----	19
3. Hipótesis-----	22
4. Objetivo General-----	23
4.1. Objetivos específicos-----	23
5. Materiales y Métodos-----	24
5.1. Organismos Experimentales-----	24
5.2. Diseño Experimental-----	24
5.3. Extracción de Triyodotironina-----	25
5.4. Radioinmunoensayo para Triyodotironina-----	26
5.5. Análisis Estadístico-----	26
6. Resultados y Discusión-----	27
6.1. Supervivencia-----	27
6.2. Crecimiento-----	28

6.3. Concentración de T_3 -----	33
6.4. Morfología Externa-----	36
7. Conclusiones-----	39
8. Literatura Citada-----	40

1 .RESUMEN

El pez blanco de Pátzcuaro *Menidia estor* es una especie de atherinópsido con un gran potencial comercial en el altiplano Mexicano, sin embargo uno de las principales limitantes durante el cultivo es el lento crecimiento de esta especie hasta la talla comercial (150-200 g) la cual se lleva a cabo en aproximadamente dos años. Es bien sabido que el crecimiento de un individuo es un proceso muy complejo que esta determinado, entre muchos otros factores, por factores endógenos como las respuestas adaptativas del sistema neuroendocrino del organismo. Entre las hormonas que juegan un papel determinante en los procesos de crecimiento y desarrollo en prácticamente todos los vertebrados están las hormonas tiroideas. La principal hormona tiroidea sintetizada por la glándula tiroides es la tiroxina o T_4 , la cual es considerada la prohormona de la hormona tiroidea bioactiva, la triyodotironina o T_3 . En el presente trabajo se diseñó una estrategia basada en el tratamiento del pez blanco con T_4 con la finalidad aumentar la tasa de crecimiento y así tratar de resolver la problemática del lento crecimiento. Para este fin se utilizaron cinco grupos experimentales de juveniles de pez blanco de 0.2 g (15 peces por réplica, tres réplicas por tratamiento) y se estudiaron tres diferentes concentraciones de T_4 añadidas en el agua de cultivo, denominados A (0.01 ppm), B (0.001 ppm) y C (0.0001 ppm); un grupo testigo (D) y un control negativo que consistió en el tratamiento con 0.5 mM de Metimazol, un inhibidor de la síntesis de hormonas tiroideas (E). El estudio tuvo una duración de cuatro meses. Durante este tiempo y de manera mensual se registraron los valores de peso de los organismos aleatoriamente y se colectaron y sacrificaron 3 peces al azar de cada réplica para analizar la concentración de T_3 en hígado e intestino. Los resultados obtenidos en los tratamientos con T_4 no mostraron mortalidad, mientras que el tratamiento E presentó la mayor mortalidad. En términos de peso, se encontró un mayor crecimiento en los tratamientos A, B y C, llegando en promedio a 1.65 g de peso corporal comparado con el tratamiento D o testigo, que en promedio pesó alrededor de 0.8 g. El tratamiento E presentó el menor crecimiento llegando solo a los 0.6 g. Se encontró

que las concentraciones utilizadas de T_4 en el agua de cultivo no incrementaron significativamente los niveles de T_3 en el hígado e intestino de los organismos para ninguno de los tratamientos, a excepción del segundo mes de tratamiento, en donde existió diferencia significativa entre los tratamientos C, D y B, para el tratamiento E no se detectaron niveles de T_3 en el tejido de los peces. En este grupo los peces presentaron también diversas malformaciones. Los resultados obtenidos en este estudio muestran claramente que el tratamiento con microdosis de hormonas tiroideas acelera el crecimiento sin afectar la supervivencia de *Menidia estor*.

2. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una tecnología que se encarga del cultivo, bajo condiciones controladas, de especies acuáticas en medios naturales y artificiales con fines de sustento y/o comerciales. Ésta es actualmente una de las mejores opciones para abastecer las demandas presentes y futuras en materia de alimentos de origen acuático, dado que el 70% de las pesquerías se encuentran en su límite sostenible de explotación. Su práctica requiere del manejo óptimo de los organismos y por ello es fundamental el conocimiento de la biología, en especial de su ciclo de vida, hábitos, tipos de alimentación, reproducción, genética, tasa de conversión del alimento y crecimiento, entre otros aspectos (AUMS, 2003).

Entre las características biológicas deseables de las especies en las que se busca lograr su cultivo exitoso se encuentran que: 1) su reproducción sea fácil y controlable, sobre todo en condiciones de cautiverio; 2) posean huevos y larvas resistentes al manejo, y sobre todo 3) que sean organismos de rápido crecimiento y fácil alimentación, esto último, permite a estos organismos aprovechar la mayor parte del alimento para aumentar su talla (FAO, 2006).

Entre las especies que han tenido gran auge en su estudio se encuentra el pez blanco del lago de Pátzcuaro, *Menidia estor*. Esta especie nativa tiene una gran importancia económica para la región pero su sobreexplotación la ha llevado al borde de la extinción. Por esta razón, la acuicultura representa una buena alternativa para evitar su desaparición, a la vez que ayudará a su producción con fines comerciales. Aunque se ha logrado su cultivo en ciclo cerrado, aún quedan diversos problemas por resolver. Uno de ellos, el cual es crucial para su producción, es el prolongado periodo de tiempo que esta especie requiere para alcanzar su talla comercial (150 g-200 g), que es de aproximadamente dos años (Martínez-Palacios *et al.*, 2006).

El crecimiento es un proceso fisiológico complejo que resulta de la interacción entre el medio ambiente y el genoma o estructura génica del organismo. Se sabe por ejemplo,

que la talla final de un individuo esta determinada, principalmente, por la interacción entre factores exógenos o epigenéticos, como la disponibilidad de alimento, y factores endógenos, como las respuestas adaptativas del sistema neuroendocrino de ese organismo. Entre las diferentes hormonas que participan en el crecimiento y desarrollo de los peces y el resto de los vertebrados se encuentran la familia de las somatomamotropinas [la hormona de crecimiento (*Growth Hormone*, GH) y la prolactina], las somatomedinas o factores de crecimiento insulinoideos (*Insuline Growth Factors*, IGFs) y las hormonas tiroideas (TH). Todas ellas participan además en otras funciones fisiológicas tales como el metabolismo, la reproducción y osmoregulación (Mommsen, 2001; Orozco y Valverde, 2005).

Como una estrategia para lograr la reducción del periodo de crecimiento, este trabajo se diseñó con el propósito de manipular el ambiente endócrino de *M. estor* y analizar su repercusión en la talla y peso del organismo. Específicamente, se analizó el efecto de la hormona tiroidea tiroxina (T_4). Esta hormona, como se revisa detalladamente en el presente trabajo, se ha asociado a procesos de crecimiento y desarrollo en vertebrados.

2.1 Generalidades de las Hormonas Tiroideas

Las TH son responsables de mantener un estado general de bienestar actuando de manera directa o en cooperación con otras hormonas en casi todos los tejidos del organismo de los vertebrados. Las acciones de las TH abarcan una amplia gama de funciones que incluyen el crecimiento y la diferenciación celular, el metabolismo energético, la reproducción y particularmente el desarrollo y maduración del sistema nervioso central (SNC). Además, participan en funciones adaptativas especie-específicas, como son la migración, metamorfosis y osmoregulación en algunos peces, la metamorfosis en anfibios, la muda de piel en los reptiles, la termogénesis y la conducta migratoria en las aves. La mayoría de la información referente a los efectos biológicos de las TH se ha generado en los mamíferos, especies en donde se sabe que

juegan un papel importante en el balance metabólico, el consumo de oxígeno y la calorificación (Norris, 1985).

2.2 Estructura de las TH

Las hormonas tiroideas y sus metabolitos son derivados yodados del aminoácido L-tirosina. La tetrayodotironina, también llamada tiroxina o T₄, es la principal hormona secretada por la glándula tiroides. La T₄ contiene cuatro átomos de yodo en su molécula y se considera una prohormona, ya que a partir de ella se produce la hormona biológicamente activa, la 3, 5, 3'-triyodo-L-tironina, comúnmente llamada T₃. Esta última contiene en su estructura solo tres átomos de yodo (figura 1) (Larsen *et al.*, 2004).



Nombre común	Símbolo	Substituyentes				Nombre sistemático
		R ₃	R _{3'}	R ₅	R _{5'}	
Tiroxina	T ₄	I	I	I	I	3,3',5,5'-Tetra-yodo-L-tironina
Triyodotironina	T ₃	I	I	I	H	3,3',5'-Tri-yodo-L-tironina
Triyodotironina reversa	rT ₃	I	I	H	I	3,3',5'-Tri-yodo-L-tironina
3, 5 –Tironina	3,5-T ₂	I	H	I	H	3,5-Di-yodo-L-tironina
3, 3' -Tironina	3,3'-T ₂	I	I	H	H	3,3'-Di-yodo-L-tironina
3',5'-Tironina	3',5'-T ₂	H	I	H	I	3',5'-Di-yodo-L-tironina

Figura 1. Estructura de las Hormonas Tiroideas. En la parte superior de la figura se muestra el núcleo de tironina. En la parte inferior la tabla resume la nomenclatura de las diversas yodotironinas de acuerdo a la posición de los sustituyentes átomos de yodo (Valverde *et al.*, 2004).

2.3 Biosíntesis de Hormonas Tiroideas

Las TH se sintetizan en la glándula tiroidea. Esta glándula es un órgano endócrino especializado y único en poseer la maquinaria enzimática y la organización anatómica para sintetizar y almacenar hormonas tiroideas.

La vía metabólica del yodo que conduce a la biosíntesis de las TH ocurre primeramente por la captura del yoduro al interior de los tirocitos; este es un proceso de transporte activo que ocurre en la región basolateral del tirocito y que es mediado por el simporter Na^+/I^- (NIS). El NIS es una glicoproteína integral de membrana que responde a TSH transportando al yodo en contra de su gradiente electroquímico (Carrasco, 1993). Posteriormente el yodo es translocado del citoplasma hacia el coloide, a través de la membrana apical. Se ha propuesto la presencia de dos proteínas transportadores del yodo en el borde apical: el transportador Cl^-/I^- ó pendrina y el AIT ó transportador apical de yodo (Scott *et al*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2002). Por otra parte, la Tg sintetizada por el tirocito es transportada vectorialmente hacia el borde apical. A lo largo de esta vía de transporte, la Tg se pliega y dimeriza, y es glucosilada, fosforilada y sulfatada. En la interfase célula-coloide el ión yoduro (I^-) es oxidado y convertido en “yodinio” (I^+) o en ácido hipoyodoso (HIO), una forma reactiva capaz de unirse o “yodar” a los residuos de tirosina presentes en la Tg. Esta yodación resulta en la síntesis de los yodoaminoácidos: monoyodotirosina o MIT y diyodotirosina o DIT. Esta compleja serie de reacciones se denomina organificación del I^- y es catalizada por la tiroperoxidasa ó TPO (Taurog, 1970). El acoplamiento de los yodoaminoácidos, catalizado también por la TPO, da origen a la T_4 y a la T_3 , yodotironinas hormonalmente activas.

El coloide puede almacenar grandes cantidades de TH en forma de Tg yodada. En respuesta a una demanda de TH, la Tg yodada es endocitada. La liberación de las yodotironinas entraña dos reacciones adicionales: la hidrólisis de la tiroglobulina y la desyodación de los residuos de tirosina. La tiroglobulina es hidrolisada en los lisosomas, por acción de proteasas tiroideas que al romper a la proteína liberan, por un

lado, a las yodotironinas que son secretadas al torrente sanguíneo, y por otro lado a las yodotirosinas. Estas últimas son desyodadas por la deshalogenasa tiroidea, rescatándose la mayor parte del yoduro libre resultante para su posterior reutilización (Solis-S *et al.*, 2004).

Como se muestra en la figura 2, en la hormonogénesis propiamente dicha participan, como ya se mencionó, al menos las siguientes siete proteínas: el simporter sodio/yoduro Na/I o NIS (por sus siglas del inglés sodium/iodine symporter); la pendrina (PDS); la tiroglobulina (Tg); diferentes chaperonas moleculares (calnexina, BiP); la tiroperoxidasa (TPO); la oxidasa tiroidea de NADPH (THOX) y la deshalogenasa tiroidea (tDh).

La síntesis y secreción de las TH está regulada por una cascada de mensajeros neuroendócrinos que inicia en el hipotálamo con la secreción de la hormona hipotalámica liberadora de la hormona estimulante de la tiroides o TRH (por sus siglas en inglés Thyrotropin-Releasing Hormone), continúa en la hipófisis con la secreción de la hormona estimulante de la tiroides o TSH y culmina en la glándula tiroides con la síntesis y secreción de las TH. Estas últimas establecen un sistema de retroalimentación negativa por el cual el aumento de su concentración plasmática inhibe la síntesis y liberación de TSH (Tresguerres, 1992).

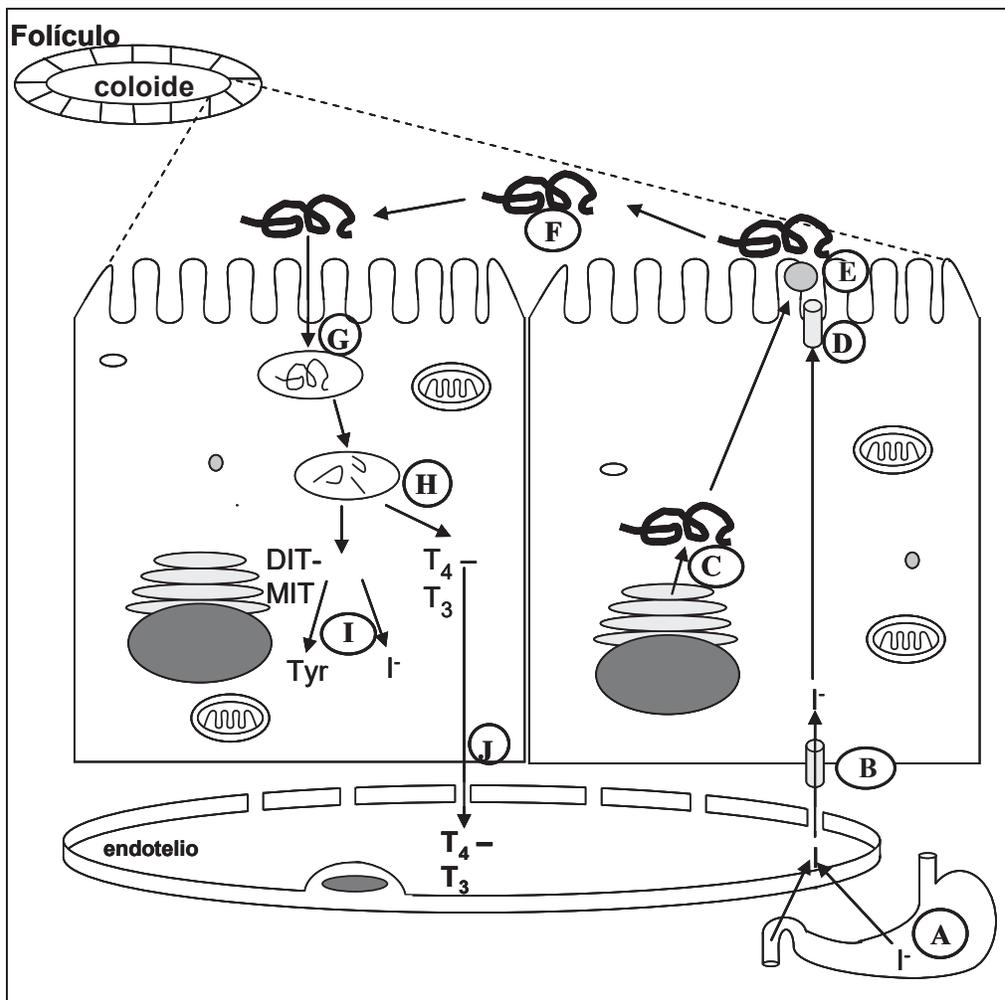


Figura 2. Síntesis, Almacenamiento y Secreción de Hormonas Tiroideas. La figura esquematiza una sección de folículo tiroideo (esquina superior izquierda) con dos tirocitos en relación al capilar sanguíneo (región basal) y a la cavidad folicular (región apical). **A, Absorción de yoduro:** el halógeno se absorbe en el tracto digestivo y pasa a la circulación. **B, Captura de yoduro:** en el polo basal y mediante el NIS, el yoduro es internado activamente por los tirocitos. **C, Síntesis de tiroglobulina (Tg).** **D, Translocación del yoduro:** en el polo apical del tirocito y mediante la acción de la Pendrina o PS el halógeno pasa hacia la cavidad folicular. **E, Organificación de yodo y síntesis de TH.** **F, Almacenamiento:** la Tg yodada que contiene en su molécula MIT, DIT, T₄ y T₃ pasa al coloide, constituyendo así un reservorio de yodo y TH. **G-H, Endocitosis y Proteólisis de la Tg:** en respuesta a la estimulación por la TSH, el coloide es endocitado, formando vesículas que se fusionan con los lisosomas. En los fagolisosomas resultantes las moléculas de Tg son digeridas, liberando MIT, DIT y TH. **I, Deshalogenación:** las yodotirosinas que no fueron acopladas son desyodadas por la tDh, favoreciendo así la reutilización del halógeno en un nuevo ciclo de síntesis de TH. **J, Secreción:** paso de las TH a la circulación a través de la membrana basolateral del tirocito (modificado de Solis-Sainz y Valverde-R., 2006; Moreno *et al.*, 1998).

2.4 Transporte de las Hormonas Tiroideas.

Las TH son moléculas altamente hidrofóbicas, por lo que circulan en la sangre unidas a proteínas transportadoras. Estas proteínas varían en concentración, afinidad a las TH y en constantes de disociación. El resultado neto de su interacción con las yodotironinas es que más del 99% de las TH circulantes se encuentran unidas a estas proteínas pero pueden ser fácilmente liberadas para su entrada a las células. Así, en condiciones normales, la concentración de hormona libre es de 0.02%, y menor de 0.3% para T_4 y T_3 , respectivamente. Así pues, la unión de las proteínas transportadoras, permite su distribución a los órganos blanco y su retención a nivel circulatorio, previniendo su pérdida renal o fecal. Se conocen principalmente tres diferentes proteínas que unen y transportan a las yodotironinas: la globulina transportadora de tiroxina o TBG, la transtiretina o TTR y la albúmina (Alb), todas ellas moléculas globulares compactas de peso molecular similar (Robbins, 2000).

La TBG y la albúmina se componen de una cadena polipeptídica, mientras que la TTR consiste en un tetrámero conformado por cuatro subunidades idénticas. En el humano, la TBG es una glicoproteína que presenta la mayor afinidad a T_4 , uniendo alrededor del 70 al 75% de esta hormona, a pesar de ser la menos abundante de las proteínas transportadoras. En general, la T_4 tiene una mayor constante de afinidad (K_i) por estas proteínas, que la T_3 y la rT_3 (Robbins, 2000; Köhrle, 1999).

2.4.1 Proteínas transportadoras en peces.

Las proteínas transportadoras de TH que han sido identificadas en peces son la albúmina y la TTR (Richardson *et al.*, 1994; Larsson *et al.*, 1985; Santos y Power, 1999). A diferencia de los mamíferos, en los peces la albúmina parece ser la principal proteína acarreadora de T_4 , ya que en ellos la TTR presenta una mayor afinidad por T_3 (Yamauchi *et al.*, 1999). TTR parece jugar un papel importante en los procesos de desarrollo y diferenciación celular en peces, ya que ha sido principalmente identificada en organismos juveniles que pasan por procesos fisiológicos como la esmoltificación

(proceso que involucra cambios fisiológicos que permiten la migración de agua dulce a agua salada, llevado a cabo por los salmónidos) y metamorfosis (Power *et al.*, 2000; Richardson *et al.*, 2005).

2.5 Metabolismo de Hormonas Tiroideas

El metabolismo de las TH involucra una compleja serie de reacciones enzimáticas que resultan en su desyodación, conjugación, desaminación o en la descarboxilación oxidativa (Fig. 3). El grado en que estas reacciones ocurran en un órgano tendrá un efecto importante sobre los niveles circulantes y tisulares de las TH y sus metabolitos. Estas reacciones metabólicas no se excluyen mutuamente, más bien pueden ocurrir secuencialmente e incluso aumentar la tasa de reacción de la otra (St. Germain y Galton, 1997). Las principales vías metabólicas de las hormonas tiroideas son la desyodación y la conjugación. La conjugación de las TH incluye la esterificación del grupo hidroxilo del anillo fenólico con ácido sulfúrico o con ácido glucurónico, lo que funcionalmente incrementa la solubilidad de las TH en agua, facilitando de esta manera su eliminación biliar o urinaria (Visser, 1996). En términos de bioactividad, la más importante de estas vías es la desyodación. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias, las vías metabólicas alternas también juegan un papel determinante (Wu *et al.*, 2005).

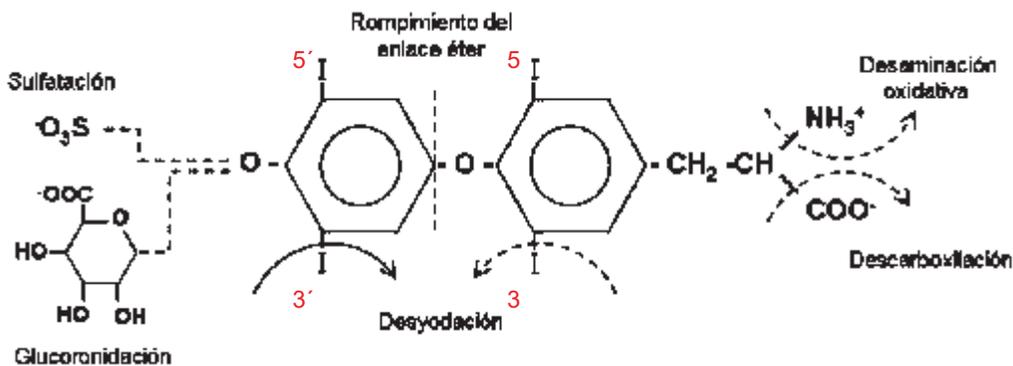


Figura 3. Vías metabólicas de la Tiroxina. Todas las vías metabólicas señaladas con líneas discontinuas inactivan a la tiroxina. La desyodación en la posición 5' ó 3' constituye la única vía metabólica de activación (Wu *et al.*, 2005).

2.5.1 Desyodación

La conversión de T_4 a las diferentes TH, incluyendo la T_3 ocurre mediante la remoción de átomos de yodo de la molécula, proceso conocido como desyodación. De esta manera, la desyodación secuencial de la T_4 genera compuestos que contienen menos átomos de yodo en su molécula, la cual se lleva a cabo en prácticamente todos los tejidos periféricos, y está catalizada por una familia de enzimas llamadas desyodasas, que comprenden tres isotipos: D1, D2 y D3. Estas enzimas difieren en sus propiedades catalíticas y muestran un distinto patrón de expresión durante el desarrollo, así como especie y órgano específico. Además, estas enzimas están reguladas diferencialmente por factores fisiológicos, patofisiológicos y medio ambientales (Eales y Brown, 1993; Bianco *et al.*, 2002, Tresguerres, 1992).

Actualmente se reconocen dos vías desyodativas. La desyodación del anillo externo, también llamada vía ORD (por sus siglas en inglés, *outer ring deiodination*) o de activación, esta catalizada por la D1 y la D2, y a través de ella se forman tironinas activas como la T_3 y la 3,5- T_2 . La vía IRD (*inner ring deiodination*) o de inactivación, esta catalizada por la D3 y produce isómeros inactivos de la T_4 o de la T_3 , como la T_3 reversa (rT_3) y la 3',5'- T_2 , respectivamente (Figura 4). Por todo lo anterior, actualmente se considera que la desyodación periférica de las hormonas tiroideas es la vía final común que determina la concentración intracelular de hormona activa o inactiva (Leatherland *et al.*, 1990; Larsen *et al.*, 1998; Eales *et al.*, 1999; Leonard *et al.*, 2000; Bianco *et al.*, 2002), lo cual hace a la desyodación el último eslabón de la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (Köhrle, 1996; 1999).

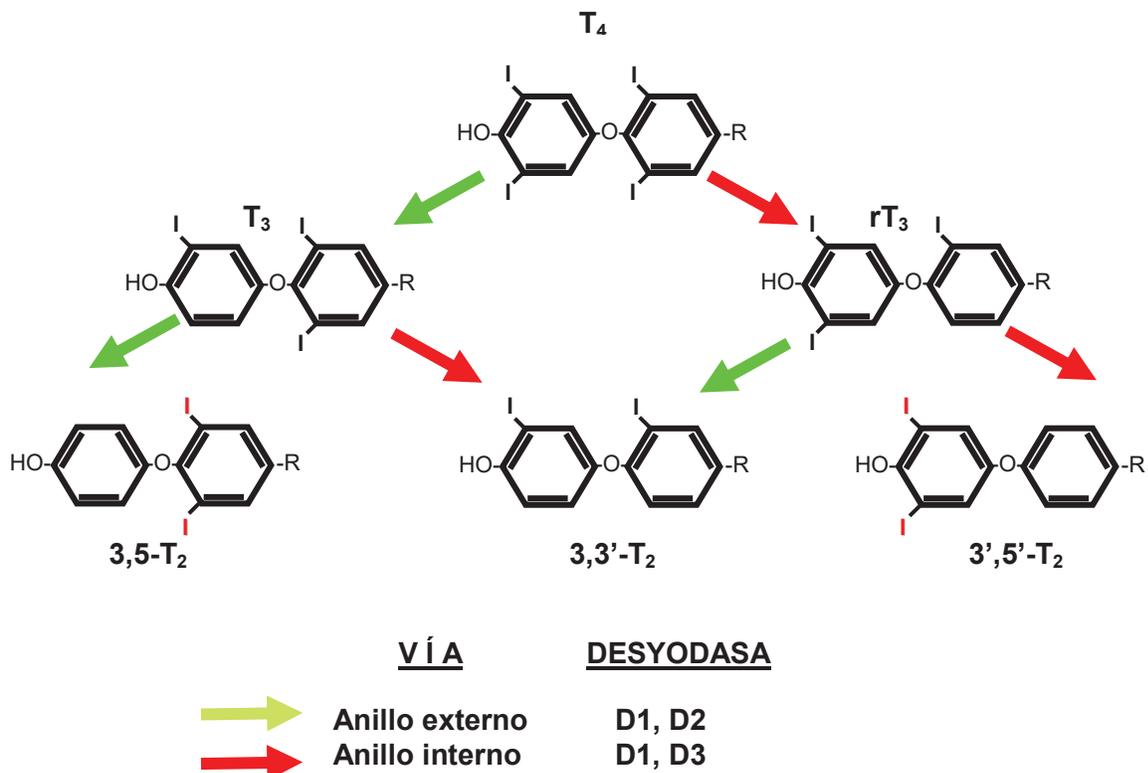


Figura 4. Vías de desyodación de las yodotironinas.

En cuanto a las desyodasas se sabe que la D1 que en la rata adulta se expresa predominantemente en el hígado, el riñón, la tiroides, la glándula mamaria lactante y la hipófisis anterior, siendo la expresión hepática la más alta (Aceves y Valverde, 1989; Bianco *et al.*, 2002; Köhrle, 1996; 1999). Por otra parte la D2 tiene una distribución más limitada que la D1, la mayor actividad se ha reportado en el SNC, la hipófisis, el tejido graso pardo y la placenta (Bianco *et al.*, 2002; St. Germain, 1999). La D2 puede ser influenciada por diferentes factores neuroendocrinos, así como condiciones fisiológicas; sin embargo, el principal factor regulatorio es el estado tiroideo. La D3 se expresa abundantemente en el SNC de todos los vertebrados estudiados a la fecha (Galton y Hierbert, 1987; Kaplan y Yaskoski, 1980; Mol *et al.*, 1998; Valverde *et al.*, 1993) y es regulada por el estado tiroideo, incrementado durante el hipertiroidismo y disminuido durante el hipotiroidismo (Becker *et al.*, 1997).

En general, la regulación de las desyodasas parece depender primordialmente de tres factores: el aporte y disponibilidad del sustrato; el balance energético del organismo y la participación de otros mensajeros neuroendocrinos.

En el caso de los peces la mayor expresión de las desyodasas se presenta en el hígado, pero también ocurre en otros tejidos como el cerebro, intestino, riñón y branquias (Darras *et al.*, 1998; Eales *et al.*, 1999; Orozco y Valverde, 2005), y la regulación de la actividad desyodativa en peces también responde a diversos factores, entre ellos se encuentran factores medioambientales y fisiológicos, tales como la calidad y la cantidad de alimento, el pH, la salinidad, la turbidez del medio etc. (Eales *et al.*, 1999; Orozco *et al.*, 2003; Orozco y Valverde, 2005).

2.6 Mecanismos de Acción

Las TH son indispensables para el mantenimiento de un estado fisiológico sano en todos los vertebrados, ya que ellas regulan la actividad metabólica de prácticamente todas las células de los organismos (Janz, 2000).

La mayoría de los efectos de las TH están mediados a través de su unión a receptores nucleares. A pesar de esto, durante las últimas décadas, la membrana plasmática, el retículo endoplásmico y la mitocondria han sido encontrados como sitios potenciales de acción de las hormonas tiroideas, por lo que se infiere que las TH también pueden tener importantes efectos no genómicos (Lazar, 1993).

2.6.1 Mecanismos Genómicos

Como ya se mencionó, las TH ejercen la mayor parte de sus acciones génicas a través de su unión a receptores nucleares de TH (TR: thyroid hormone receptors). Estos receptores forman parte de la superfamilia de receptores nucleares, a la que también pertenecen los receptores a hormonas esteroideas, a vitamina D y a ácido retinoico, entre otros, los cuales actúan como factores de transcripción inducibles por la hormona (Yen, 2006). Así, la unión de las TH con su receptor provoca un cambio conformacional de este que se traduce en un intercambio de coreguladores y proteínas accesorias y culmina es la regulación de la expresión de genes tironino-dependientes (Yen, 2001; Aranda y Pascual, 2001). Estos genes contienen secuencias específicas del DNA conocidas como elementos de respuesta a hormonas tiroideas (TRE), las cuales son reconocidas por los TR de tal forma que de la naturaleza del complejo TRE-TR-TH depende que la expresión genética pueda ser activada o inhibida (Wu y Koenig, 2000). A la fecha se conocen más de 200 genes cuya regulación depende de TH. Algunos de estos genes se muestran en la tabla 1:

Tabla 1: Principales efectos y genes regulados por TH en mamíferos.

FUNCIÓN	EFECTO	GENES REGULADOS
Calorigénesis	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ glucólisis y consumo de oxígeno. • Síntesis de agentes desacoplantes en la grasa parda (UCP). 	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ UCP 1, 2 y 3. Bomba Na,K-ATPasa (subunidad α y β).
Crecimiento y diferenciación celular	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Crecimiento somático. Maduración del sistema nervioso • Osificación epifisaria. 	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ GH.
Sistema Nervioso Central	<ul style="list-style-type: none"> • Esenciales en el desarrollo y maduración neuronal. • Modulan la velocidad de conducción-excitación y patrones de conducta. 	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ β5-tubulina; NGF; Taka; RORA; los CAMK-IV; PCP-2; COX-1; laminita; RC3. • ↓ Tenascina C; NCAM; L1; SWAP; p75LNGFR; TOM M70A; A1 y β2 tubulina; etc.
Carbohidratos	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ absorción y utilización de glucosa, glucogenólisis. • Degradación de insulina. 	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ PEPCK; G6P; GLUT4.
Corazón	<ul style="list-style-type: none"> • Efecto inotrópico y cronotrópico. • Sinergismo con catecolaminas. 	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ α-miosina (cadena pesada); SERCA; receptores β adrenérgicos. • ↓ β-miosina (cadena pesada).
Lípidos	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Síntesis, degradación y excreción de colesterol y ácidos biliares. 	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Enzima málica; proteína S14; carbonil reductasa; FATP.
Músculo	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ Conversión de creatinina a fosfocreatinina. 	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ MBP. • ↑ Actina y creatininasa.
Metabolismo hidroelectrolítico	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Filtración glomerular y diuresis extracelular de sodio 	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Na,K-ATPasa (subunidades α y β); intercambiador Na⁺/H⁺
Hipotálamo / Hipófisis	<ul style="list-style-type: none"> • Regulan la síntesis y secreción de TRH, TSH, GH, FSH, LH y PRL. 	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ GH. • ↓ TRH; TSH (subunidad α y β); PRL.
Tubo digestivo	<ul style="list-style-type: none"> • Regulan la velocidad del tránsito 	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Na,K-ATPasa (subunidad α y β);

	<p>intestinal.</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↑ Absorción de vitamina B12 y ácido fólico. 	<p>Fosfatasa alcalina.</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↓ Lactasa.
--	--	---

En donde: ↑ aumento o estimulación; ↓ disminución o inhibición; TSH, hormona estimulante de la tiroides; GH, hormona del crecimiento; FSH, hormona foliculo estimulante; LH, hormona luteinizante; PRL, prolactina; UCP, proteina desacoplante; NGF, factor de crecimiento neuronal; Taka, receptor a tirosina cinasa A; RORA, receptor nuclear huérfano alfa; CAMK-IV, protein cinasa dependiente de calmodulina; PCP-2, proteina de las células de Purkinje tipo 2; COX-1, ciclooxigenasa tipo 1; RC3, neurogranina; NCAM, molécula de adhesión a células neuronales; L1; SWAP, proteina asociada al "switch"; p75LNGFR, receptor a neurotrofina de baja afinidad; TOM M70A, homologo 70ª de la translocasa de la membrana mitocondrial interna; SERCA, ATPasa dependiente de calcio del reticulo sarcoplásmico; PEPCK, fosfoenol piruvato carboxicinasa; G6P, glucosa-6-fosfatasa; MBP, proteina que une miosina; FATP, proteina transportadora de ácidos grasos. (Solís-S y Valverde-R, 2006).

2.6.2 Mecanismos no Genómicos

Aún cuando el principal mecanismo de acción de las TH es a través de modular la transcripción génica, los efectos de estas hormonas no están restringidos a la identificación del complejo hormona-receptor en el TRE del gen blanco. Las TH también ejercen efectos rápidos actuando a nivel de la membrana celular o por modulación directa ligando-dependiente de funciones de enzimas y proteínas. Estos mecanismos rápidos no genómicos no están plenamente dilucidados, sin embargo se sabe que estos difieren de los genómicos en que inducen respuestas a tiempos cortos y no responden a inhibidores de la transcripción o traducción (Davis y Davis, 1996; Oppenheimer, 1999; Yen, 2001).

Los efectos no genómicos se han atribuido principalmente a las yodotironinas T_4 , $3,3'$ - T_2 y $3,5$ - T_2 . podrían ejercer ciertas acciones, entre éstas se pueden mencionar la regulación del transporte de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y glucosa, la activación de la PKC (protein kinase C), PKA (protein kinase A) y MAPK (mitogen-activated protein kinase), etc. Se ha sugerido que podría existir un receptor de membrana similar a los que existen para algunos esteroides (integrina $\alpha\beta_3$) (Davis *et al.*, 2008). Estos mecanismos incluyen: 1) fosforilación de TR, 2) estados de alteración entre TR y proteínas coreguladoras, y 3) tráfico intracelular de proteínas (Zhu, *et al.*, 1998; Maruvada, *et al.*, 2003).

2.7 Efectos Biológicos de las Hormonas Tiroideas

2.7.1 Metabolismo energético.

Las TH regulan el metabolismo energético en todos los vertebrados, sin embargo, aún no son claros los mecanismos a través de los cuales estas hormonas ejercen dicha regulación. Actualmente se cuenta con evidencia experimental que sugiere la participación tanto de mecanismos nucleares como extranucleares. La primera evidencia del efecto nuclear de la T_3 fue aportada por Tata *et al.*, (1962, 1963) quienes

mostraron que la administración de T_3 a ratas hipotiroideas inducía un incremento en el consumo de oxígeno (tasa metabólica basal), mientras que la coadministración de T_3 y actinomicina D abolía completamente dicho efecto, sugiriendo así que T_3 actuaba a nivel transcripcional (nuclear).

Por otra parte, los efectos de las TH sobre el metabolismo energético tienen características que sugieren su interacción con otros componentes extranucleares. Ciertos efectos son independientes de receptores nucleares o de síntesis proteínica y son evidentes en un lapso corto. La mitocondria ha sido considerada un blanco de las yodotironinas debido a su papel en la transducción energética celular (Goglia *et al.*, 1999). De hecho, el estado tiroideo influye tanto en el número como en la actividad de las mitocondrias. Las TH estimulan la síntesis de enzimas que participan en la cadena respiratoria e incrementan la concentración de la Na, K-ATPasa en la membrana mitocondrial así como la permeabilidad a Na^+ y K^+ . Además, la T_3 regula la función mitocondrial en diversos tejidos metabólicamente activos como el hígado, el músculo, el riñón y el corazón (Soboll, 1993). Además se ha propuesto que T_3 pudiera unirse a receptores específicos en la mitocondria y de esta manera modular el recambio y la biogénesis mitocondrial (Lanni *et al.*, 2001).

2.7.2 Efectos sobre el crecimiento.

Las hormonas tiroideas son esenciales para el crecimiento. El hipotiroidismo resulta en un importante retardo del crecimiento, tanto en especies endotérmicas como el humano (Snyder, 2000), la rata (Evans *et al.*, 1966) y la zarigüeya (Buaboocha y Gemmell, 1996), como en especies ectodérmicas, como la lagartija (Gerwien y John-Alder, 1992), la tortuga (Denver y Licht, 1991) y algunas especies de peces (Matty, 1985). Dicho retardo en el crecimiento en los mamíferos es el resultado tanto de la reducción en la secreción de la GH por la hipófisis anterior, de una acción deteriorada de la GH y de efectos secundarios no relacionados a la GH (Snyder, 2000).

Se ha demostrado que la acción regulatoria de las TH sobre la GH se da a nivel genómico, ya que el gen que codifica para GH presenta elementos de respuesta a TH (TRE) en su promotor (Koenig *et al.*, 1987). De hecho GH fue el primer gen en el que fue descrito TRE. Además, las hormonas tiroideas tienen efectos sobre el factor de crecimiento insulinoide tipo 1 (IGF-1), que es el mediador de algunos de los efectos anabólicos y mitogénicos de la GH. Así pues, el estado tiroideo modula la concentración de IGF-1, así como su bioactividad y la concentración de las proteínas transportadoras de este (Miell *et al.*, 1993).

2.7.3 Efectos sobre el crecimiento y desarrollo en peces.

Las TH participan en diferentes aspectos de la fisiología tiroidea de peces teleósteos, como son la maduración sexual, la osmoregulación y la conducta migratoria. También se ha documentado su papel crucial en el desarrollo temprano y en la metamorfosis, el metabolismo, el crecimiento somático, la pigmentación de la piel, entre otros (Dickhoff *et al.*, 1978; Janz, 2000; Power *et al.*, 2001; Orozco y Valverde, 2005; Yamano, 2005).

El desarrollo de los peces puede ser dividido en varias fases, las cuales incluyen la etapa embrionaria, la etapa larvaria, la etapa juvenil y la etapa adulta. En todas estas etapas se han demostrado efectos de la TH en distintas especies. Así, se ha encontrado una correlación positiva entre el estado tiroideo y el estado reproductivo, observándose un aumento estacional en los niveles de yodotironinas que coincide con la maduración gonadal y la reproducción (Cyr y Eales, 1996). El papel de las TH en la embriogénesis y la etapa larvaria se ha inferido debido a la cuantificación de estas hormonas en los huevos en donde se ha encontrado que las TH se distribuyen en el saco vitelino, y que su origen es materno (Tagama e Hirano, 1990). En especies migratorias, como los salmónidos, las TH están relacionadas con la esmoltificación, una serie compleja de cambios bioquímicos, morfológicos y conductuales que preadaptan al individuo para la fase marina de su ciclo de vida. Así, se ha descrito que las

yodotironinas parecen facilitar la adaptación del pez al medio ambiente marino, y en especies migratorias favorecen la preferencia por este medio (Norris, 1985).

La alteración en la síntesis y/o la secreción de las TH en cualquier etapa del desarrollo de larvas y juveniles tiene importantes consecuencias en su viabilidad (Power *et al.*, 2001).

Por otro lado, diversos estudios han mostrado que larvas de algunas especies de teleósteos responden a la exposición a TH. Por ejemplo, se sabe que la administración exógena de T₄ induce la metamorfosis precoz y la esmoltificación, acelera la reabsorción del saco vitelino e induce el crecimiento (de Jesus e Hirano, 1992; de Jesus *et al.*, 1998; Inui y Miwa, 1985; Tagawa e Hirano, 1987). Incluso la administración exógena de TH por simple inmersión aumenta la maduración de oocitos, favorece un aumento en la supervivencia larvaria, sincroniza la metamorfosis, entre otros fenómenos. (Gavlik *et al.*, 2002; Solbakken *et al.*, 1999; Stickney y Liu, 1999; Subburaju *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 1995). Algunos de los efectos de las hormonas tiroideas, principalmente sobre crecimiento y supervivencia se resumen en la tabla 2:

Tabla 2: Efectos en la supervivencia y crecimiento por la administración de TH en algunas etapas del desarrollo de peces.

Especie	Tratamiento / Edad	Hormona (Días de exposición)	Dosis	Supervivencia	Crecimiento	Referencia
<i>Sarotherodon mossambicus</i>	IL / 2 dph	T ₄ (9)	0.1 ppm	+	+	Lam, 1980
<i>Tilapia nilotica</i>	IL / 3 dph	T ₄ (30)	0.1-0.3 ppm	ND	+	Nacario, 1983
<i>Cyprinus carpio</i>	IL, IH / 2 dph	T ₄ (8)	0.01-0.05 ppm	+	+	Lam y Sharma, 1985
<i>Carassius auratus</i>	IL / 30 dph	T ₄ (40)	0.05 y 0.1 ppm	ND	+	Reddy y Lam, 1992
<i>Epinephelus coioides</i>	IL / 30 dph	T ₃ , T ₄ (15)	0.01, 0.1, 1 ppm	0.01-0.1 (+) 1 ppm (-)	ND	De Jesús <i>et al.</i> , 1998
<i>Paralichthys dentatus</i>	IL / 50 dph	T ₄ (30)	0.1 ppm	=	Aceleró metamorfosis	Schreiber y Specker, 1998
<i>Danio rerio</i>	IL / 5 dph	T ₄ (42)	0.03 ppm	ND	+	Lam <i>et al.</i> , 2005
<i>Salvelinus alpinus</i>	Juveniles / 120 dph	T ₄ (5)	50, 75 mg/kg dieta	ND	+	Martinez <i>et al.</i> , 1995
<i>Morone saxatilis</i>	IM	T ₃	20mg/kg peso	+	+	Brown, 1988 y 1989
<i>Siganus guttatus</i>	IM	T ₄	1, 10, 100 µg/g peso	+	=	Ayson y Lam, 1993
<i>Pagrus major</i>	IM	T ₃	20mg/kg peso	-	-	El-Zibdeh <i>et al.</i> , 1996
<i>Seriola lalandi</i>	IMP	T ₃	20mg/kg peso	+	-	Tachihara <i>et al.</i> , 1997

En donde: **IL**: Inmersión de larvas, **IH**: inmersión huevos, **IM**: inyección a madre, **IMP**: inyección a madre y padre, **dph**: días después de eclosión, +: mayor al tratamiento control; -: menor al tratamiento control, =: sin diferencia significativa con el tratamiento control, **ND**: no determinado.

Adicionalmente, estudios en el pez cebra (*Danio rerio*) han demostrado que las TH exógenas aceleran el crecimiento de la aleta pélvica e inducen una diferenciación precoz de las aletas pectorales; mientras que la exposición a tiourea (inhibidor de la síntesis de TH) inhibe la metamorfosis de larva a juvenil (Brown, 1997).

Estos y otros trabajos han permitido dilucidar que las TH juegan un papel crucial en el desarrollo de la mayoría de las especies de peces estudiadas. La participación de las TH en estos procesos parece ser tanto directo estimulando el crecimiento, como indirecto, a través de la inducción de la expresión del gen de la GH (Evans, 1998).

3 Hipótesis

Así, la hipótesis del presente proyecto postula que la exposición a diferentes concentraciones de T_4 en estadios tempranos del desarrollo de *Menidia estor*, causará efecto sobre la tasa de crecimiento de esta especie.

4 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto de la administración de tiroxina en el crecimiento y supervivencia de juveniles del pez blanco de Pátzcuaro *Menidia estor*.

4.1. Objetivos Específicos

- 1) Evaluar el efecto de diferentes microconcentraciones de tiroxina sobre el crecimiento de juveniles de pez blanco.
- 2) Evaluar la supervivencia de juveniles de *M. estor* sometidos a distintas concentraciones de T₄.
- 3) Determinar si la administración exógena de T₄ incrementa los niveles de T₃ en el hígado e intestino de *M. estor*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

La evaluación del efecto de la administración de tiroxina sobre el crecimiento y la supervivencia de los organismos experimentales se llevó de la siguiente manera:

5.1. Organismos experimentales

Los organismos experimentales se obtuvieron de la planta de producción de Pez Blanco del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (IIAF-UMSNH). Para el desarrollo del presente estudio se utilizaron juveniles de 3 meses de edad, los cuales fueron aclimatados por una semana en el sistema experimental previo al inicio del experimento, siendo alimentados con nauplios de *Artemia ad libitum* tres veces al día, desde el inicio hasta el final del mismo.

5.2. Diseño Experimental

Para la realización del experimento se utilizó un sistema cerrado en el cual se incluyeron 15 canaletas de 40 litros de capacidad y en cada una se colocaron 15 individuos juveniles. El estudio incluyó a cinco grupos experimentales, con 3 repeticiones por tratamiento (Figura 5). Los parámetros ambientales estandarizados para todos los tratamientos fueron los siguientes: temperatura de 25 °C; salinidad de 5 ppm; y fotoperiodo natural de 12:12 horas luz:oscuridad.

Los grupos experimentales se conformaron de la siguiente manera: un grupo testigo (sin tratamiento), tres grupos tratados con 3 diferentes microconcentraciones de T₄ [0.01, 0.001, 0.0001 ppm (previamente solubilizada en 0.05 N de NaOH)] y un grupo testigo negativo, el cual fue tratado con 0.5 mM de metimazol (MMI), un inhibidor de la biosíntesis de TH (Farwell y Braveman, 2001). Los tratamientos con T₄ y MMI fueron

incluidos en el agua de cultivo por ocho horas, tres veces por semana. El experimento tuvo una duración de cuatro meses.



Figura 5: Sistema de canaletas utilizadas durante los 120 días de experimentación.

Las variables de respuesta fueron: *i*) la supervivencia, la cual que se cuantificó diariamente; *ii*) el crecimiento en términos de longitud y el peso, y *iii*) la concentración intratisular (hígado e intestino) de T_3 . Los muestreos se realizaron cada 30 días, sacrificándose 3 organismos por réplica con una sobredosis de benzocaina, inmediatamente después el cuerpo del pez fue congelado a -80°C .

5.3. Extracción de Triyodotironina

Para la cuantificación de T_3 en el hígado e intestino de los organismos experimentales primeramente se realizó la extracción de la hormona (García-G. *et al.*, 2004). Brevemente: se sonicó el tejido de los peces en 1:10 (w/v) de una solución

metanol:amonio (99:1). Los homogenizados se centrifugaron (12, 000 g por 10 minutos) y los sobrenadantes se colectaron y desecaron en un concentrador al vacío. La muestra fue reconstituida en 50 μ l de buffer Tris-HCl (0.05M, pH 8.6).

5.4. Radioinmunoensayo para T₃

El contenido de T₃ en el tejido de los peces fue medido por RIA el cual es una técnica cuyo principio se basa en la competencia que se establece al unirse a anticuerpos específicos, entre la sustancia a cuantificar y cantidades conocidas de la misma sustancia marcada con un isótopo radiactivo. Los resultados se obtienen al medir la radiactividad de la hormona marcada unida al anticuerpo y la de la hormona marcada libre mediante un contador de gamma. (Moss, *et al.*, 1982).

Dicha medición se realizó mediante la metodología descrita anteriormente por Orozco *et al.*, (1992). Brevemente: el buffer utilizado fue Tris-HCl (0.05M, pH 8.6), la mezcla de incubación incluyó: el anticuerpo (anti-T₃ policlonal de conejo en una dilución 1:20,000), suero hipotiroideo, la solución radioactiva (5 pg/100 μ l de triyodotironina marcada con ¹²⁵I), la curva estándar (T₃: de 12.5 a 800 pg/dl), o muestra experimental, la cual se centrifugó por 2 minutos a 10,000 g previo a realizar el análisis. La separación se realizó con una solución de carbón/dextrán 0.5% centrifugando a 2500 rpm por 15 min a 4°C.

5.5. Análisis estadístico

Las diferencias entre los tratamientos se determinaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, posteriormente para determinar el efecto en el desarrollo de los organismos se llevó acabo una prueba múltiple de medias de Tukey con un nivel de significancia del 95%.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Supervivencia

La evaluación de la supervivencia de los juveniles nos indica que ésta fue similar entre el grupo testigo y los grupos tratados con las distintas microconcentraciones de T_4 (Figura 6), Este resultado muestra que a las dosis utilizadas en este estudio, la administración exógena de T_4 no tiene efectos deletéreos e indica que esta técnica sea apropiada para su uso en esta especie. Sin embargo, como se esperaba, al inhibir la síntesis de TH, el tratamiento con MMI disminuyó significativamente ($P < 0.05$) la supervivencia de los peces. Este resultado destaca la importancia de la presencia de las hormonas tiroideas para el desarrollo de los organismos.

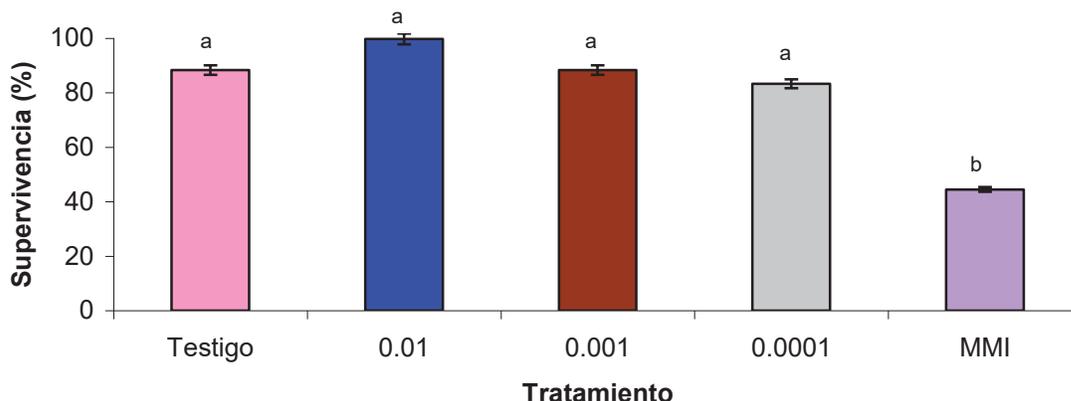


Figura 6. Efecto sobre la supervivencia de juveniles de pez blanco en los cinco diferentes tratamientos.

Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en otros estudios muestran que la administración de TH aumenta la supervivencia de larvas y juveniles de teleósteos (Brown y Bern, 1989; Lam, 1994). En el presente trabajo no se observaron diferencias significativas entre el grupo testigo y los tratados con T_4 sin embargo la carencia de la hormona (tratamiento con MMI) redujo el porcentaje de supervivencia a

menos del 45%. En este sentido, Traveset *et al.* (2003) obtuvieron resultados similares trabajando con larvas del lenguado *Solea senegalensis*, en donde los grupos testigo y aquellos tratados con tiroxina tuvieron las más altas supervivencias en comparación con el grupo tratado con MMI. Este último presentó una mortalidad del 80%. De Jesus *et al.* (1998) reportó que larvas de 2 meses de edad de *Epinephelus coicoides* (mero) tratadas con T₄ (0.01 a 1 ppm) tuvieron supervivencias más altas que aquellas en el grupo testigo.

Por otra parte, y aunque no son estrictamente comprobables, los resultados obtenidos para *Menidia estor* en este estudio difieren con los encontrados para larvas del lenguado *Paralichthys dentatus* (Schreiber y Specker, 1998). Estos autores no encontraron diferencias significativas entre los organismos del grupo testigo, los animales tratados con T₄ o con tiourea (otro inhibidor de la síntesis de TH). Sin embargo, la dosis de hormona que estos autores administraron fue 30 veces mayor que la utilizada por nosotros y el periodo de estudio fue solo de 30 días.

6.2. Crecimiento

Los juveniles de pez blanco tuvieron una respuesta positiva a la administración de T₄ en relación a su crecimiento, con diferencias que se traducen en un incremento del 58% más de peso corporal en los peces expuestos a T₄ (Figura 7) comparados con los peces del grupo testigo (P<0.05). No obstante estas diferencias se hicieron evidentes a partir de los 60 días de tratamiento. Respecto de los peces tratados con MMI tuvieron el menor crecimiento siendo significativamente diferente (P<0.05) con los peces tratados con T₄ y los peces testigo. No se observaron diferencias significativas en el crecimiento entre los juveniles tratados con distintas microconcentraciones de T₄.

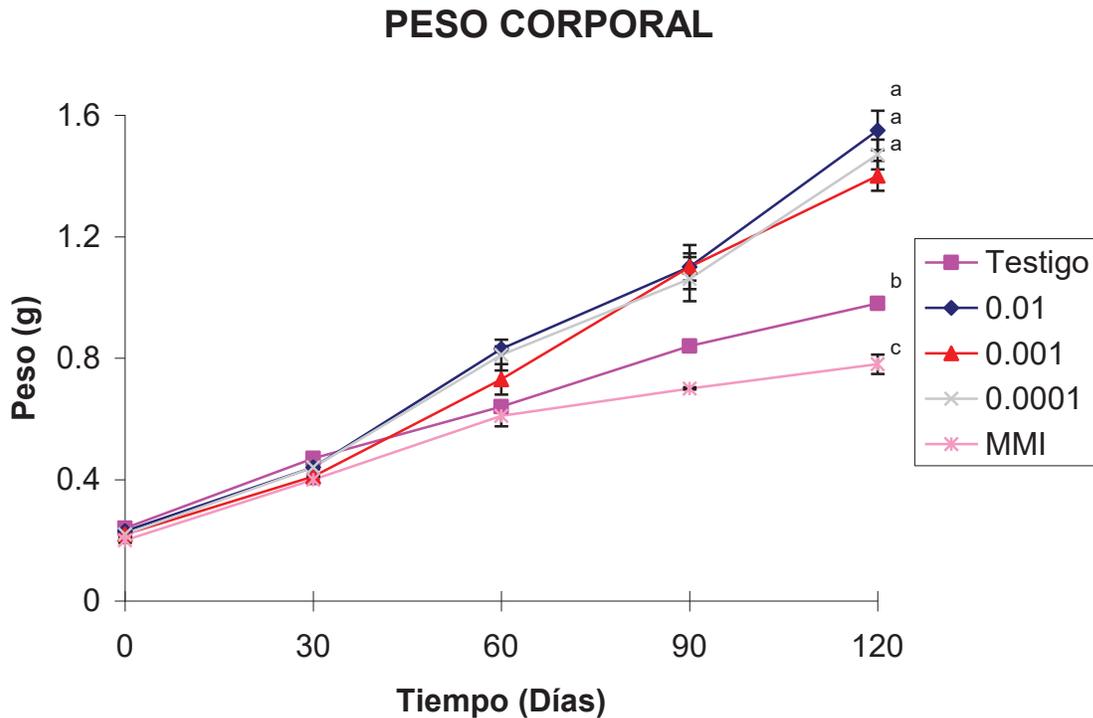


Figura 7. Efecto de la administración de tiroxina sobre el crecimiento, en términos de peso corporal (g).

Los resultados del crecimiento en términos de longitud fueron similares a los encontrados en la ganancia de peso de los organismos (Figura 8). El crecimiento de los peces tratados con las diferentes microconcentraciones de tiroxina fue significativamente mayor al de los peces testigo ($P < 0.05$). Estas diferencias se pudieron observar a partir de los 90 días de tratamiento periodo en el cual los peces testigo detuvieron su crecimiento. En contraste, los peces tratados con MMI presentaron el menor crecimiento, lo cual concuerda con los resultados de supervivencia en este grupo.

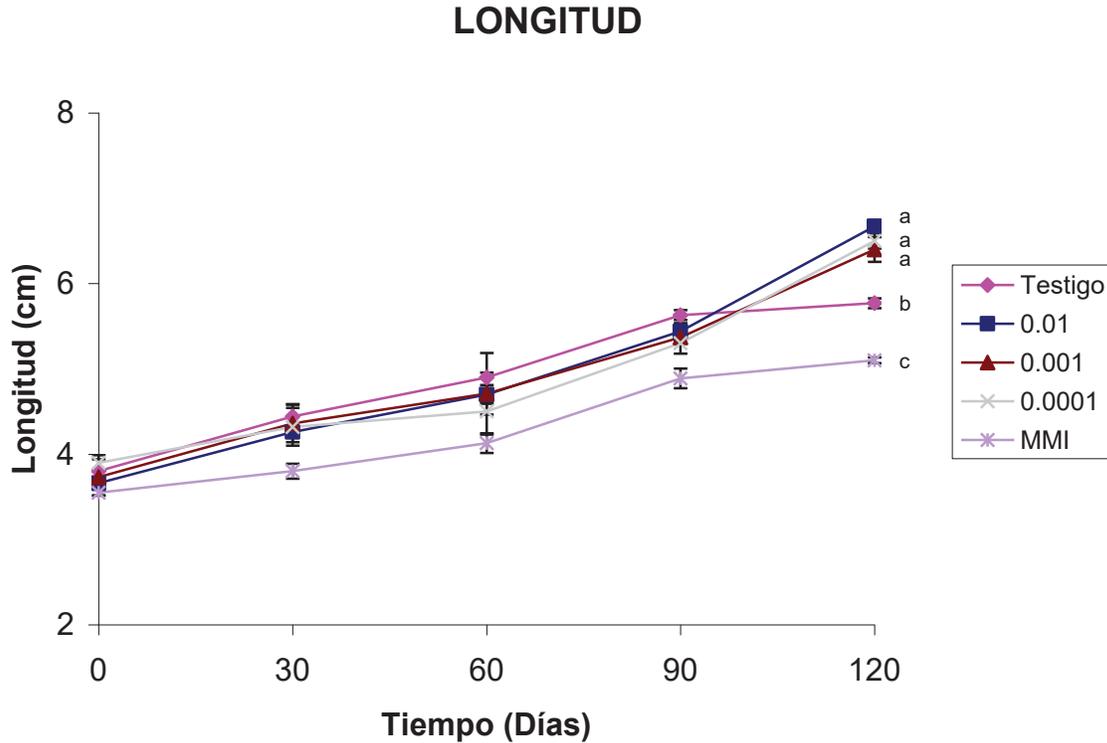


Figura 8. Crecimiento en términos de longitud de los juveniles de los diferentes tratamientos.

Estos resultados muestran que a las microdosis empleadas, la administración de T_4 aumenta la supervivencia y estimula el crecimiento de juveniles de *M. estor* y que la inhibición de la síntesis de las TH reduce la supervivencia y el crecimiento. Lo anterior confirma el hallazgo del efecto positivo de las hormonas tiroideas sobre el crecimiento de esta especie.

La importancia de las TH sobre el crecimiento se ha observado en otras especies de peces. Shelbourn *et al.* (1992) demostraron que el suplemento con TH en la dieta se acompaña de una mayor ganancia de peso, comparado con los peces testigo en alevines de *Oncorhynchus kisutch* (Salmón plateado). Resultados semejantes se observaron en juveniles de trucha ártica (*Salvelinus alpinus*) en donde el suplemento

con TH en combinación con una temperatura de 12 °C resultó en peces con un mayor crecimiento y mejor desarrollo que los peces no suplementados (Martinez *et al.*, 1995).

Sin embargo, también se han descrito estudios en los cuales las hormonas tiroideas no presentan efectos sobre el crecimiento de peces. Por ejemplo Reddy y Lam (1991) no encontraron diferencias en el crecimiento de larvas de *Oreochromis mossambicus* (*Tilapia mossambica*) control y expuestas a diferentes concentraciones de TH.

A pesar de la importancia de las hormonas tiroideas ya mencionada, existen especies de peces que presentan otro tipo de efectos ante la exposición a estas hormonas. Este es el caso del lenguado *Solea senegalensis* en donde se observó un crecimiento más lento en larvas tratadas con T₄, que con aquellas no tratadas (Traveset *et al.*, 2003), pero estas larvas aceleraron la metamorfosis. Para *M. estor* no se encontraron este tipo de efectos, por lo contrario se obtuvo un mejor crecimiento y supervivencia con la administración exógena de esta hormona.

Estos estudios comparativos demuestran la importancia de la administración de hormonas tiroideas, con las cuales es posible, en primer término obtener ganancias de crecimiento tanto en peso corporal como en la talla de los organismos expuestos, y en segundo término una aceleración en la metamorfosis sin aumento significativo en el peso, obteniendo diversos resultados, estos comparados con los organismos testigo (Tabla 3).

Tabla 3: Efecto sobre el crecimiento y desarrollo de la tiroxina en peces..

Espece	Edad	Días de tratamiento	Dosis	Aumento del Crecimiento (Peso)	Referencia
<i>Menidia estor</i>	90 dph	120	0.0001-0.01 ppm	58%	Presente estudio
<i>Salvelinus alpinus</i>	119 dph	35	Dieta	47%	Martinez <i>et al.</i> , 1995
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	84 dph	70	Dieta	18%	Shelbourn <i>et al.</i> , 1992
<i>Paralichthys dentatus</i>	27 dph	30	0.03 ppm	- A. M.	Schreiber y Specker, 1998
<i>Solea senegalensis</i>	15 dph	15	0.1 ppm	- A. M.	Traveset <i>et al.</i> , 1998

En donde: **dph**: días después de eclosión, -: no hubo diferencia con el control, **A. M.**: Aceleró metamorfosis.

Como se muestra en la tabla, los juveniles de pez blanco demostraron una elevada ganancia en peso (58%), en comparación con estudios similares en otras especies, en las que se obtuvieron porcentajes de aumento menores. Es importante mencionar que la vía de administración, el tiempo de exposición a la hormona tiroidea o la dosis de ésta varía entre estos trabajos, pero a pesar de esto nuestros resultados son alentadores para continuar los estudios con la aplicación de estas hormonas en el pez blanco de Pátzcuaro con la finalidad de resolver su problema de lento crecimiento.

En otras observaciones en el lenguado (*Paralichthys dentatus*) muestran que los peces sometidos a un inhibidor tiroideo presentaron el menor crecimiento, (Schreiber y Specker, 1998). Estos últimos resultados son similares a los descritos previamente en el presente trabajo con respecto al tratamiento con MMI.

También se ha observado que un tratamiento con MMI provocó efectos diversos en la morfología externa de larvas de pez cebra (*Danio rerio*). La longitud de los peces

expuestos al tratamiento con T_4 fue mayor comparada con las larvas tratadas con MMI, sin embargo los organismos de ambos tratamientos tuvieron un crecimiento similar al testigo. Solo después de 20 días de tratamiento, los organismos tratados con MMI fueron diferentes a los del grupo testigo (Lam *et al.*, 2005). Este resultado esta de acuerdo con lo reportado en el presente estudio, ya que el crecimiento de los juveniles de pez blanco expuestos a MMI fue diferente de los peces testigo y a los peces tratados con T_4 hasta después de 30 días de tratamiento.

6.3. Concentración de T_3

Para corroborar que los efectos observados en los juveniles de *M. estor* tras la administración exógena de tiroxina fueron provocados en efecto como consecuencia del cambio en el estado tiroideo, se realizó la cuantificación de T_3 en el hígado y el intestino de estos organismos. Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas en la concentración de T_3 ($P < 0.05$) de la menor microconcentración de T_4 (0.0001 ppm) con el testigo y la microconcentración intermedia (0.001) hasta el segundo mes de experimentación; no presentando ningún tratamiento diferencia ($P > 0.05$) con la mayor microconcentración (0.01 ppm). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos y concentraciones de T_4 y el testigo en ningún punto anterior o posterior al segundo mes de exposición (Figura 9).

Como ya se mencionó, en general no existió un aumento significativo en la concentración de T_3 con la administración exógena de T_4 , solo a los 60 días, esto debido posiblemente a una acumulación de ésta hormona la cual después se ve reducida tal vez por acción de las desyodasas pues es bien conocida su actividad en la transformación metabólica de estas hormonas.

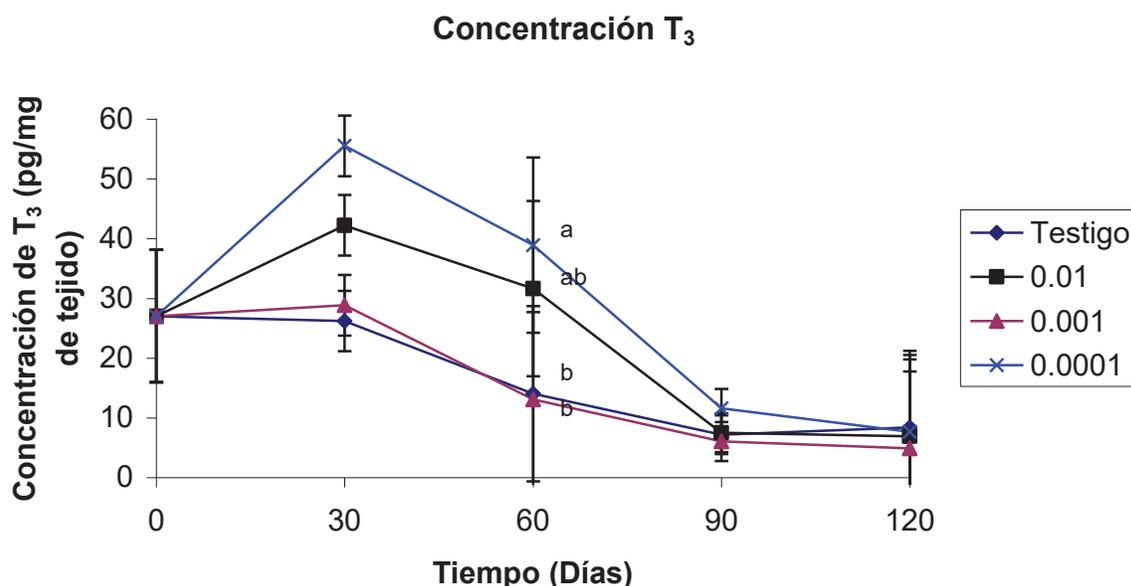


Figura 9. Concentraciones de T₃ en el hígado e intestino de juveniles de *M. estor*, a lo largo de los 120 días de experimentación.

La similitud en la concentración de T₃ en todos los tratamientos experimentales (figura 9) puede deberse a que esta hormona fue utilizada en el crecimiento, de tal manera que este efecto se ve reflejado en las diferencias encontradas entre los parámetros de peso corporal y longitud, como ya se ha demostrado en algunas especies de peces (Higgs *et al.*, 1982).

De hecho, se puede observar que la concentración de T₃ presenta una tendencia a disminuir conforme transcurre el tiempo de experimentación, con una mayor concentración a los 30 días y una menor a los 120 días. Conforme se reduce la concentración de T₃ se observa un aumento significativo en el crecimiento somático de los organismos expuestos a T₄, lo que apunta a su utilización para inducir esta respuesta.

El patrón de concentración de T₃ encontrado en este trabajo es muy similar a la reportada en otras especies, como es el caso del sigano manchado (*Siganus guttatus*),

tanto en adultos como en larvas, en donde se encuentra que el nivel de T_3 tras pocos días de ser sometidos los organismos a una inyección de T_4 , comienza a disminuir drásticamente, esto posiblemente debido a su utilización o a una eliminación por la desyodasa tipo 3 (Ayson y Lam, 1993). En cuanto a *Pimephales promelas*, sin administración exógena, se observó una disminución de T_3 a edades tempranas (9 dph) lo cual podría reflejar un menor requerimiento de TH cuando el pez esta ya bien desarrollado o ha llegado a etapas adultas (Crane *et al.*, 2004).

En contraste a las observaciones del presente trabajo, Cyr y colaboradores (1998) encontraron que la concentración de T_3 se incrementa conforme aumenta el crecimiento somático de adultos del bacalao (*Gadus morhua*). Esto sin ningún tratamiento exógeno de estas hormonas. En el caso de *M. estor*, en las condiciones ya mencionadas, se encontró que aunque se presenta una disminución en la concentración de T_3 durante el periodo experimental, el crecimiento de los organismos expuestos a T_4 exógena es mayor que el de aquellos que no fueron expuestos a esta hormona, sugiriendo la posible acción de las microconcentraciones de tiroxina exógenas en el crecimiento de los juveniles de pez blanco.

Cabe destacar que la concentración de T_3 para los peces expuestos al MMI no fue detectable en ninguno de los muestreos durante los 4 meses; esto por la función inhibitoria de la síntesis de TH del metimazol y al acompañarse de un reducido crecimiento y supervivencia de los peces tratados, se sugiere fuertemente que la presencia de hormonas tiroideas parece ser esencial para un correcto desarrollo de esta especie.

La ausencia de T_3 tras un tratamiento con agentes inhibidores de la síntesis de TH, ha sido también encontrada por otros grupos de investigación, tales como, Alexander y colaboradores y Schreiber y Specker, (1998) los cuales en *Oncorhynchus kisutch* y *Paralichthys dentatus*, respectivamente, observaron que la exposición a estos agentes reduce la concentración de esta hormona en plasma de tal forma que es imposible su detección.

6.4. Morfología externa

Además de observar diferencias en los procesos fisiológicos mencionados en los juveniles de pez blanco por la inhibición de las TH, también se encontraron cambios en la morfología externa de los organismos. Un caso similar fue reportado por Lam *et al.* (2005), con los peces cebra expuestos a MMI los cuales presentaron diversas malformaciones, crecimiento reducido, pigmentación anormal, incorrecto desarrollo de aletas, entre otras. En el presente estudio se observaron también diversas malformaciones en los organismos hipotiroideos. En la figura 10 se muestra una comparación entre los peces de los diferentes tratamientos, diferenciándose claramente los peces tratados con MMI. Las malformaciones observadas en estos peces son: aletas cortas, abdomen hundido, pigmentación oscura, entre otras (Figura 11). Estos resultados confirman nuevamente la importancia de las TH en el correcto desarrollo de los organismos de pez blanco de Pátzcuaro.

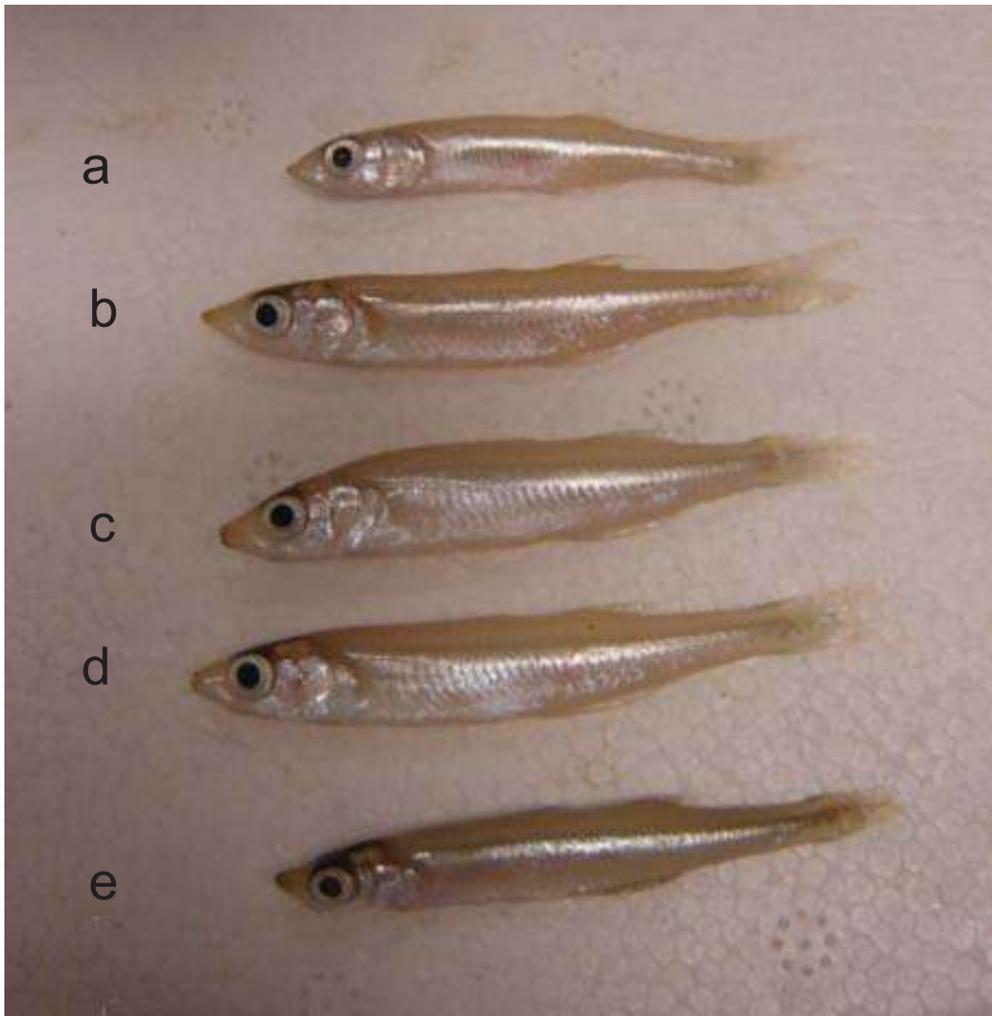


Figura 10: Organismos de *M. estor* después de 120 días de tratamiento.
a) Testigo; b) T₄ 0.01 ppm; c) T₄ 0.001 ppm; d) T₄ 0.0001 ppm; e) Metimazol 0.5 mM.



Figura 11. *M. estor* después de 120 días de tratamiento con 0.5 mM de metimazol.

7. CONCLUSIONES

- La hormona tiroidea tiroxina administrada exógenamente no afecta la supervivencia de juveniles del pez blanco de Pátzcuaro (*Menidia estor*)
- La administración exógena de microconcentraciones de T_4 tiene un efecto positivo en el crecimiento de juveniles de *M. estor*, siendo la microconcentración de 0.0001 ppm suficiente para estimular el crecimiento en esta especie.
- La administración de T_4 no aumentó significativamente la concentración de T_3 en hígado e intestino en los diferentes tratamientos por lo que tal vez esta hormona exógena fue utilizada para aumentar el crecimiento de juveniles de *M. estor*.
- Los juveniles hipotiroideos de *M. estor* presentaron un efecto negativo en el crecimiento y no pudo ser detectada la concentración de T_3 en hígado e intestino, demostrándose la importancia de estas hormonas para su óptimo desarrollo.

Los resultados de este trabajo demuestran que el tratamiento con hormonas tiroideas acelera el crecimiento de juveniles de *M. estor*, por lo que se hace factible el uso de esta hormona con el fin de aumentar la talla y reducir el tiempo de crecimiento del pez blanco en condiciones de cultivo, aspecto muy importante en el cultivo de atherinópsidos (Somoza *et al.*, 2008).

8. LITERATURA CITADA

1. Aceves C & Valverde C. 1989. Type I, 5'-monodeiodinase activity in the lactating mammary gland. *Endocrinology* 124, 2818-2820.
2. Alexander, G., Sweeting, R. & Mckeown, B. 1998. The Effect of Thyroid Hormone and Thyroid Hormone Blocker on Visual Pigment Shifting in Juvenile Coho Salmon (*Oncorhynchus Kisutchi*). *Aquaculture* 168: 157–168.
3. Aquaculture Underwriting Management Services Ltd (AUMS). 2003. *Global historical perspectives on aquaculture insurance*. Aquaculture Underwriting and Management Services. Lewes, East Sussex, U. K.
4. Aranda, A. & Pascual, A. 2001. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiol Rev* 81: 1269-1304.
5. Ayson, F.G. & Lam, T.J. 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.
6. Becker, K.B., Stephens, K.C., Davey, J.C., Schneider, M.J. & Galton, V.A. 1997. The type 2 and type 3 iodothyronine deiodinases play important roles in coordinating development in *Rana catesbeiana* tadpoles. *Endocrinology* 138: 2989-2997.
7. Bianco, A.C., Salvatore, D. & Gereben, B. 2002. Biochemistry, Cellular and Molecular Biology, and Physiological Roles of Iodothyronine Selenodeiodinases. *Endocr Rev* 23 (1):38-89.

8. Brown, C.L. & Bern, H.A. 1989. Thyroid Hormones in Early Development, with Special Reference to Teleost Species. *In*: "Development, Maturation and Senescence of Neuroendocrine Systems (C. G. Scanes And M. P. Schreibman, Eds.) 289–306. Academic Press, New York.
9. Brown, C.L., Doroshov, S.I., Nunez, J., Hadley, C., Nishioka, R.S. & Bern, H.A. 1988. Maternal Triiodothyronine Injection Cause Increases in Swimbladder Inflation and Survival Rates in Larval Striped Bass, *Morone Saxatilis*. *J. Exp. Zool.* 248: 168–176.
10. Brown, C.L., Doroshov, S.I., Cochran, M.D. & Bern, H.A. 1989. Enhanced Survival of Striped Bass Fingerlings after Maternal Triiodothyronine Treatment. *Fish Physiol. Biochem.* 7: 295–299.
11. Brown, D.D. 1997. The Role of Thyroid Hormone in Zebrafish and Axolotl Development. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 94:13011–13016.
12. Buaboocha, W. & Gemmell, R.T. 1996. The effect of methimazole on the growth of the developing brushtail possum, *Trichosurus vulpecula*. *Growth Dev. Aging* 60: 163-169.
13. Crane, H.M., Pickford, D.B., Hutchinson, T.H. & Brown, J.A. 2004. Developmental Changes of Thyroid Hormones in the Fathead Minnow, *Pimephales Promelas*. *General and Comparative Endocrinology* 139: 55–60.
14. Cyr, D.G. & Eales, J.G. 1996. Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish. *Rev. Fish. Biol. Fish.* 6: 165-200.
15. Cyr, C.G., Idler, D.R., Ce'Line Audet, M.J.M. & Eales, J.G. 1998. Effects of Long-Term Temperature Acclimation on Thyroid Hormone Deiodinase Function, Plasma Thyroid Hormone Levels, Growth and Reproductive Status of Male Atlantic Cod, *Gadus Morhua*. *General and Comparative Endocrinology* 109: 24–36.

16. Darras, V.M., Mol, K.A., Van Der Geyten, S. & Kuhn, E.R. 1998. Control of Peripheral Thyroid Hormone Levels by Activating and Inactivating Deiodinases. *Trends Comp. Endocrinol. Neurobiol.* 839: 80–86.
17. Davis, P.J. & Davis, F.B. 1996. Nongenomic Actions of Thyroid Hormone. *Thyroid* 6 (5): 497-504.
18. Davis, P., Leonard, J. & Davis, F. 2008. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Frontiers in Neuroendocrinology* 29: 211-218.
19. De Jesus, E.G. & Hirano, T. 1992. Changes in Whole Body Concentrations of Cortisol, Thyroid Hormones and Sex Steroids during Early Development of the Chum Salmon, *Oncorhynchus keta*. *General and Comparative Endocrinology* 85: 55-61
20. De Jesus, E.G., Toledo, J.D. & Simpas, M.S. 1998. Thyroid Hormones Promote Early Metamorphosis in Grouper (*Epinephelus Coioides*) Larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.* 112: 10-16.
21. Denver, R.J. & Licht, P. 1991. Dependence of body growth on thyroid activity in turtles. *J. Exp. Zool.* 258: 48-59.
22. Dickhoff, W.W., Folmar, L.C. & Gorbman, A. 1978. Changes in Plasma Thyroxine During Smoltification of Coho Salmon, *Oncorhynchus Kisutch*. *Gen. and Comp. Endocrinol.* 36:229–232.
23. Eales, J.G. & Brown, S.B. 1993. Measurement and Regulation of Thyroidal Status in Teleost Fish. *Rev. Fish. Biol. Fisheries* 3 (4): 299–347.
24. Eales, J.G., Brown, S.B., Cyr, D.G., Adams, B.A. & Finnsen, K.R. 1999. Deiodination as an Index of Chemical Disruption of Thyroid Hormone Homeostasis and Thyroidal Status in Fish. *In: Environmental Toxicology and Risk Assessment: Standardization of*

Biomarkers for Endocrine Disruption and Environmental Assessment, Volume 8, ASTM STP 1364, D.S. Henshel, M.C. Black, and M.C. Harrass, Eds. American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, Pa.

25. El-Zibdeh, M. K., *et al.* 1996. Effect of Triiodothyronine Injection of Broodstock Fish on Seed Production in Cultured Seawater Fish. *Suisanzoshoku* 44: 487–496.
26. Evans, E.S., Schooley, R.A., Evans, A.B., Jenkins, C.A. & Taurog, A. 1966. Biological evidence for extrathyroidal thyroxine formation. *Endocrinology* 78: 983-1001.
27. Evans, D.H. 1998. The Physiology of Fishes. Crc Press Llc. Second Edition. 519 pp. U. S. A.
28. FAO. 2006. State of World Aquaculture. Rome.
29. Farwell A.P. & Braverman, L.E. 2001. Thyroid and antithyroid drugs. *In*: Hardman JG, Limbird LE, Goodman Gilman A, editors Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. 10th ed. New York: McGraw-Hill. p. 1563-79.
30. Galton VA & Hierbert A 1987. The ontogeny of iodothyronine 5-deiodinase activity in *Rana catesbiana* tadpoles at different stages of the life cycle. *Endocrinology* 121: 42-47.
31. García, C., Jeziorski, M.C., Valverde, C. & Orozco, A. 2004. Effects of Iodothyronines on the Hepatic Outer-Ring Deiodinating Pathway in Killifish. *General & Comparative Endocrinology* 135: 201–209.

32. Gavlik, S., Albino, A. & Specker, J.L. 2002. Metamorphosis in Summer Flounder: Manipulation of Thyroid Status to Synchronize Settling Behaviour, Growth and Development. *Aquaculture* 203: 359-373.
33. Gerwien, R.W. & John-Alder, H.B. 1992. Growth and behaviour of thyroid deficient lizards (*Sceloporus undulatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 87: 312-324.
34. Goglia, F., Moreno, M. & Lanni, A. 1999. Action of thyroid hormones at the cellular level: the mitochondrial target. *FEBS Lett.* 452: 115–120.
35. Higgs, D.A., Fagerlund, U.H.A., Eales, J.G. & McBride, J.R. 1982. Application of thyroid hormones and steroid hormones as anabolic agents in fish culture. *Comp. Biochem. Physiol. B* 73: 143–176.
36. Inui, Y. & Miwa, S. 1985. Thyroid Hormone Induces Metamorphosis of Flounder Larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.* 60 (3): 450-454.
37. Janz, D.M. 2000. Endocrine System. *In: The Laboratory Fish*, G.K.Ostrander, Ed., Chap. 25. Academic Press, San Diego.
38. Kaplan MM & Yaskoski KA. 1980. Phenolic and tyrosil ring deiodination of iodothyronines in rat brain homogenates. *J. Clin. Invest.* 66: 551-562.
39. Koenig, R.J., Brent, G.A., Warne, R.L., Larsen, P.R. & Moore, D.D. 1987. Thyroid hormone receptor binds to a site in the rat growth hormone promoter required for induction by thyroid hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5670-5674.
40. Körle J. 1996. Thyroid hormone deiodinase – a selenoenzyme family acting as gate keepers to thyroid hormone action. *Acta Med. Austriaca* 23: 17-30.

41. Körle, J. 1999. Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. *Mol. Cell. Endocrinol.* 151: 103-119.
42. Lam, T.J., 1980. Thyroxine Enhances Larval Development and Survival in *Sarotherodon (Tilapia) Mossambicus* Rupell. *Aquaculture* 21: 287–291.
43. Lam, T.J. & Sharma, R. 1985. Effects of the Salinity and Thyroxine on Growth and Development in the Carp, *Cyprinus Carpio*. *Aquaculture* 44: 201-212.
44. Lam, T.J., 1994. Hormones and Egg/Larval Quality in Fish. *Journal of World Aquaculture Society* 25: 2–12
45. Lam, S.H., Sin, Y.M., Gong, Z. & Lam, T.J. 2005. Effects of Thyroid Hormone on the Development of Immune System in Zebrafish. *General and Comparative Endocrinology* 142: 325–335.
46. Lanni, A., Moreno, M., Lombardi, A., de Lange, P. & Goglia, F. 2001. Control of energy metabolism by iodothyronines. *J. Endocrinol. Invest.* 24: 897-913.
47. Larsen, P.R., Davies, T.F. & Hay, I.D. 1998. The Thyroid Gland. *In*: Wilson J. B., Hoster, D., Cronenberg, H. M. & Larsen, P. R., eds. *William's Textbook of Endocrinology*, 9th ed. W. B. Saunders, Philadelphia, 389-515.
48. Larsen, P., Davies, T.F. & Schlumberger, M.J. 2004. Fisiología del Tiroides y Evaluación Diagnóstica de los Pacientes con Trastornos Tiroideos. *Tratado de Endocrinología*. Madrid, Elsevier Saunders 363-410.
49. Larsson, M., Petterson, T. & Carlstrom, A. 1985. Thyroid-hormone binding in the serum of 15 vertebrate species: Isolation of thyroxine binding globulin and prealbumin analogs. *Gen. Comp. Endocrinol.* 58: 360–375.

50. Lazar, M.A. 1993. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocrine Reviews*. 14: 184-193.
51. Leatherland, J.F., Reddy, P.K., Yong, A.N., Leatherland, A., & Lam, T.J. 1990. Hepatic 5-Monodeiodinase Activity in Teleosts *in Vitro*- A Survey of 33 Species. *Fish. Physiol. Biochem.* 8 (1):1-10.
52. Leonard, J.L. & Köhrle, J. 2000. Intracellular Pathways of Iodothyronine Metabolism. *In: Braverman L. E., Utiger, R. D., eds. The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp136-173.
53. Martinez, I., Dreyer, B., Agersborg, A., Leroux, A., & Boeuf, G. 1995. Effects of T3 and Rearing Temperature on Growth and Skeletal Myosin Heavy Chain Isoform Transition During early Development in the Salmonid *Salvelinus alpinus* (L.) *Comp. Biochem. Physiol.* 4 (112B): 717-725
54. Martínez, P.C., Racotta, I.S., Rios, D.G., Palacios, E.M., Toledo, C.M. & Ross, L.G. 2006. Advances in Applied Research for the Culture of Mexican Silversides (*Chirostoma, Atherinopsidae*). *Biocell.* 30 (1): 137-148.
55. Matty, A.J. 1985. The thyroid gland. *In: Fish Endocrinology.* Croom Helm, Australia. pp 54-83, 267.
56. Maruvada, P., Baumann, C.T., Hager G.L., *et al.* 2003. Dynamic shuttling and intranuclear mobility of nuclear hormone receptors. *J Biol Chem.* 278:12425-12432.
57. Miell, J.P., Taylor, A.M., Zini, M., Maheshwari, H.G., Ross, R.J.M. & Valcavi, R. 1993. Effects of hypothyroidism and hyperthyroidism on insulin-like growth factors (IGFs) and growth hormone and IGF-binding proteins. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76: 950-955.

58. Mol K.A., Van der Geyten, S., Burel C., Kühn E.R., Boujard T. & Darras V.M. 1998. Comparative study of iodothyronine outer ring and inner ring deiodinase activities in five teleostean fishes. *Fish Physiol. Biochem.* 18: 253-266.
59. Mommsen, T.P. 2001. Paradigms of Growth in Fish. *Comp Biochem. Physiol. B* 129: 207-219.
60. Moreno, M., Lombardi, P., Goglia, F. & Lanni, A. 1998. Effect of 3,5-diiodo-L-thyronine on thyroid stimulating hormone serum levels in hypothyroid rats. *Life Scie.* 62: 2369-2377.
61. Moss, A.J., Dalrymple, G.V. & Boyd C.M. 1982. Practical Radioimmunoassay. Ed. The C. V. Mosby Company,. Saint Louis. 200 pp.
62. Nacario, J.F. 1983. The Effect of Thyroxine on the Larvae and Fry of *Sarotherodon Niloticus* L. *Tilapia Nilotica*. *Aquaculture*. 34: 73–83.
63. Norris, D.O. 1985. *Vertebrate Endocrinology*. Chap 8. Lea & Febiger. USA. pp 161-202.
64. Oppenheimer, J.H. 1999. Evolving concepts of thyroid hormone action. *Biochimie*. 81: 539-543.
65. Orozco, A., Ruiz, J.A. & Valverde, R.C. 1992. The Importance of Employing Serum Free of Thyronines in Radioimmunoassays to Assess Circulating Thyroid Hormones in Rainbow Trout. *Bol Estud Med Biol Mex.* 40: 41-47.
66. Orozco, A., Fenton, B. & Valverde, R.C. 2003. Temporal Profile of the Outer- and Inner-Ring Iodothyronine Deiodinase Pathways in the Liver and Skin of the Rainbow Trout, *Oncorhynchus Mykiss*. *Fish Physiol Biochem.* 29: 297-303.

67. Orozco A. & Valverde, R.C. 2005. Thyroid Hormone Deiodination in Fish. (Review). *Thyroid* 15: 799-813.
68. Power, D.M., Elias, N.P., Richardson, S.J., Mendes, J., Soares, C.M.; & Santos, C.R.A. 2000. Evolution of the Thyroid Hormone-Binding Protein, Transthyretin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 119: 241–255.
69. Power, D.M., Llewellyn, L., Faustino, M., Nowell, M.A, Björnsson, B., Einarsdo, I.E., Canario, A.V.M. & Sweeney, G.E. 2001. Thyroid Hormones in Growth and Development of Fish. *Comp Biochem Physiol Part C* 130: 447-459.
70. Reddy, P.K. & Lam, T.J. 1991. Effect of Thyroid Hormones on Morphogenesis and Growth of Larvae and Fry of Telescopio-Eye Black Goldfish, *Carassius Auratus*. *Aquaculture* 107: 383–394.
71. Reddy, P.K. & Lam, T.J. 1992. Role of Thyroid Hormones in Tilapia Larvae (*Oreochromis Mossambicus*) 1: Effects of the Hormones and an Antithyroid Drug on Yolk Absorption, Growth and Development. *Fish Physiol Biochem.* 9: 473-485.
72. Richardson, S.J., Bradley, A.J., Duan, W., Wettenhall, R.E.H., Harms, P.J., Babon, J.J., Southwall, B.R., Nicol, S., Donnellan, S.C. & Schreiber, G. 1994. Evolution of marsupial and other vertebrate thyroxinebinding plasma proteins. *Am. J. Physiol.* 266: R1359–R1370.
73. Richardson, S.J., Monk, J.A., Shepherdley, C.A., Ebbesson, L.O.E., Sin, F., Power, D.M., Frappell, P.B., Kohrle, J. & Renfree, M.B. 2005. Developmentally regulated thyroid hormone distributor proteins in marsupials, a reptile, and fish. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288: R1264–R1272.

74. Robbins, J. 2000. Thyroid hormone transport proteins and the physiology of hormone binding. In: Braverman LE y Utiger RD (Eds.) Werner and Ingbar's *The Thyroid. A Fundamental and Clinical Text*. 8a ed. Lippincott-Raven publishers. EUA. pp 220-234.
75. Santos, C.R.A. & Power, D.M. 1999. Identification of Transthyretin in Fish (*Sparus Aurata*): cDNA Cloning and Characterisation. *Endocrinology* 140: 2430-2433.
76. Schreiber, A.A. & Specker, J.L. 1998. Metamorphosis in the Summer Flounder (*Paralichthys Dentatus*): Stage-Specific Developmental Response to Altered Thyroid Status. *Gen. Comp. Endocrinol.* 111 (2): 156-166.
77. Shelbourn, J.E., Clarke, W.C., McBrideb, J.R., Fagerlundb, U.H.L. & Donaldson, E. M. 1992. The Use of 17 α -Methyltestosterone and Triiodothyronine for Sterilizing and Acelerating the Growth of Zero-Age Coho Salmon Smolts (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 103: 85-99.
78. Snyder, P.J. 2000. The pituitary in hipothyroidism. In: Braverman, L.E. & Utiger, R.D. (Eds.) Werner and Ingbar's *The Thyroid. A Fundamental and Clinical Text*. 8a ed. Lippincott-Raven publishers. EUA. pp 811-814.
79. Soboll, S. 1993. Thyroid hormone action on mitochondrial energy transfer. *Biochim. Biophys. Acta* 1144: 1-16.
80. Solbakken, J.S., Norberg, B., Watanabe, K. & Pittman, K. 1999. Thyroxine as a mediator of metamorphosis of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, *Environ. Biol. Fish.* 56: 53-65.
81. Solís, S.J.C. y Valverde, R.C.M. 2006. Hipotiroidismo Neonatal: Fisiopatogenia, Aspectos Moleculares, Metabólicos y Clínicos. *Rev. Invest. Clin.* 58: 318-334.

82. Somoza, G.M., Miranda, L.A., Berasain, G.E., Colautti, D., Lenicov, M.R. & Strüssmann, C.A. 2008. Historical aspects, current status and prospects of pejerrey aquaculture in South America. *Aquaculture research* 39: 784-793.
83. St. Germain, D.L. & Galton, V.A. 1997. The deiodinase family of selenoproteins. *Thyroid* 7: 655-668.
84. St. Germain DL. 1999. Development effects of thyroid hormone: the role of deiodinases in regulatory control. *Biochem. Soc. Trans.* 27: 83-88.
85. Stickney, R.R. & Liu, H.W. 1999. Maintenance of Broodstock, Spawning and Early Larval Rearing of Pacific Halibut, *Hippoglossus Stenolepis*. *Aquaculture* 176: 75–86.
86. Subburaju, S., Wan, L.S.C. & Lam, T.J. 1998. Effect of administering sustained-release thyroxine microparticles on reproductive performance and egg quality in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) broodstock, *J. Appl. Ichthyol.* 14: 233–237.
87. Tachihara, K. *et al.* 1997 Improved Seed Production of Goldstriped Amberjack *Seriola Lalandi* Under Hatchery Conditions by Injection of Triiodothyronine (T3) to Broodstock Fish. *J. World Aquat. Soc.* 28: 34–44.
88. Tagawa, M. & Hirano, T. 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.
89. Tagama, M. & Hirano, T. 1990. Changes in tissue and blood concentrations of thyroid hormones in developing chum salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* 76: 437-443.
90. Tanaka, M., Tanangonan J.B., Tagawa M., De Jesus, E.G., Nishida, H., Isaka, M., Kimura, R. & Hirano, T. 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.

91. Tata, J.R., Ernster, L. & Lindberg, O. 1962. Control of basal metabolic rate by thyroid hormones and cellular function. *Nature* 193: 1058-1060.

92. Tata, J.R. 1963. Inhibition of the biological action of thyroid hormones by actinomycin D and puromycin. *Nature* 197: 1167-1168.

93. Traveset, R., Santamaría, C.A., Estévez, A., Sala, R., Villalta, M. & Crespo, S. 2003. Efecto de la Tiroxina y Tiourea sobre la Metamorfosis del Lenguado *Solea Senegalensis*: Resultados Preliminares. Memorias del IX Congreso Nacional de Acuicultura. Cádiz, España. Libro de Actas, 309-312.

94. Tresguerres, J.A.F. 1999. Fisiología Humana. Interamericana-McGraw-Hill, 2ª ed. Madrid. 1216 pp.

95. Valverde CR, Aceves C & Reyes ZE. 1993. Ontogenesis of iodothyronine deiodinase activities in brain and liver of the chick embryo. *Endocrinology* 132: 867-872.

96. Valverde, R. C., Orozco, A., Becerra, A., Jeziorski, M. C., Villalobos, P. & Solís, S.J.C. 2004. Halometabolites and Cellular Dehalogenase Systems: An Evolutionary Perspective. *International Review of Cytology* 234: 143-199.

97. Visser, T.J. 1996. Pathways of thyroid metabolism. *Acta Med. Austriaca* 23: 10-16.

98. Wu, Y. & Koenig, R.J. 2000. Gene Regulation by Thyroid Hormone. *Trends Endocrinol. Metab.* 11: 207-211.

99. Wu, S., Green, W.L., Huang, W., Hays, M.T. & Chopra, I.J. 2005. Alternate pathways of thyroid hormone metabolism. *Thyroid* 15: 943-958.

100. Yamano, K. 2005. The Role of Thyroid Hormone in Fish Development with Reference to Aquaculture. *Jarq.* 39 (3): 161 – 168.
101. Yamauchi, K., Nakajima, J.I., Hayashi, H. & Hara, A. 1999. Purification and characterization of thyroid hormone binding protein from masu salmon serum: A homolog of higher-vertebrate transthyretin. *Eur. J. Biochem.* 265: 944–949.
102. Yen, P.M. 2001. Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action. *Physiol Rev.* 81 (3): 1097-1142.
103. Yen, P.M. 2006. Cellular Action of Thyroid Hormone. *In: Degroot, Lj. The Thyroid and its Diseases.* Chicago, Thyroid Disease Manager, 167-192.
104. Zhu, X.G., Hanover, J.A., Hager, G.L.; *et al.* 1998. Hormone-induced translocation of thyroid hormone receptors in living cells visualized using a receptor green fluorescent protein chimera. *J Biol Chem.* 273: 27058-27063