

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



OSMOREGULACION EN EL BOTETE DIANA *Sphoeroides annulatus* DURANTE SU DESARROLLO ONTOGENICO Y PRIMER ESTADIO JUVENIL

T E S I S

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

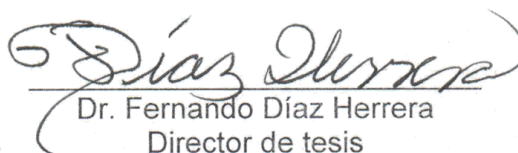
JAVIER PÉREZ ROBLES

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. MARZO DEL 2014

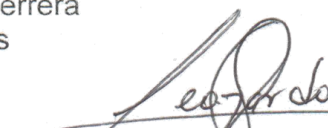
RESUMEN de tesis de **Javier Pérez Robles**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de DOCTOR EN CIENCIAS en Ecología Molecular y Biotecnología. Ensenada, Baja California. Marzo del 2014.

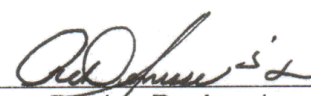
OSMOREGULACION EN EL BOTETE DIANA *Sphoeroides annulatus*
DURANTE SU DESARROLLO ONTOGENICO Y PRIMER ESTADIO JUVENIL.

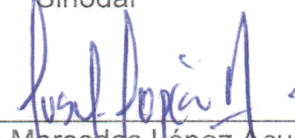
Resumen aprobado por:


Dr. Fernando Díaz Herrera
Director de tesis


Dra. Ivone Giffard Mena
Sinodal


Dr. Leonardo Ibarra Castro
Sinodal


Dra. Denise Re Araujo
Sinodal


Dra. Lus Mercedes López Acuña
Sinodal


Dr. Thomas Gunter Kretzschmar
Sinodal

El botete diana *Sphoeroides annulatus* es una especie con potencial para la acuicultura en los estados del Noreste de México, habita principalmente en estuarios y zonas costeras del Pacífico Mexicano. Para evaluar su osmorregulación en distintas etapas de su desarrollo ontogénico, fue necesario

desarrollar cuatro experimentos (a 28°C); el primer experimento se realizó con juveniles exponiéndolos a diferentes salinidades (de 10 a 41 ups), no hubo un efecto en la tasa de consumo de oxígeno (TCO), tasa de excreción de amonio (TEA), ni en la relación de oxígeno-nitrógeno (O:N) presentando valores de 27.9 a 30.9 mg O₂.h⁻¹.kg⁻¹ (TCO), 0.600 a 0.691 mg NH₄⁺.h⁻¹.kg⁻¹ (TEA) y de 53.12 a 59.26 (relación O:N). Las salinidades afectaron significativamente a la expresión de la ATPasa de Na⁺/K⁺ cuyos valores fueron de 4.0 a 7.8 Log₁₀ No. de copias de ARNm, identificando un patrón de osmorregulación lineal con una pendiente de 0.042, hiperosmorregulando en salinidades bajas (10 ups) e hiposmorregulando en altas (>17 ups), con un punto isosmótico (PI) de 356 mOsm.kg⁻¹.

En el segundo experimento; un grupo de juveniles fue expuesto a cambios graduales de salinidad (41 a 17 ups y de 17 a 41 ups), ocurrió un efecto significativo de la salinidad sobre la TCO, el TEA y la relación O:N, presentando valores de 23.71 a 33.92 mg O₂.h⁻¹.kg⁻¹, 1.01 a 1.46 mg NH₄⁺.h⁻¹.kg⁻¹ y 22.20 a 30.44 respectivamente. Se corroboró un patrón de osmorregulación lineal con pendientes cercanas a 0 con organismos hiposmorregulando en salinidades superiores a 17 ups. La expresión de la ATPasa de Na⁺/K⁺ presentó una forma de “U” dónde los valores más altos se presentaron en las la salinidad de 41 ups y los más bajos en 17 ups (4.20 a 7.43 Log₁₀ No. de copias de ARNm).

En el tercero se revisó el efecto de las salinidades de 5, a 40 ups sobre el desarrollo embrionario de *S. annulatus*; encontrando los valores más bajos de los porcentajes de eclosión (PE) y de supervivencia (PS) en la salinidad de 5 ups y los más altos en 35 ups (PE; 2.6 a 93.8%, PS; 7.8% a 97.43%), solo en 5 ups se encontraron larvas deformes (26.67%). Desde que las larvas eclosionaron, se presentó un patrón de osmorregulación lineal con pendiente cercana a cero, los embriones hiperosmorregularon en salinidades bajas (5 y 12 ups) e hiposmorregularon en altas (>12 ups), cuyos PI oscilaron de 342.8 a 435.5 mOsm.kg⁻¹.

El cuarto experimento se realizaron dos análisis considerando distintas etapas del desarrollo larvario; eclosión, apertura de la boca, siete días después de la eclosión (DDE), 14, 21, y 28 DDE, en el primer análisis se revisó el efecto de la salinidad constante, y en el segundo el efecto de cambios bruscos de salinidad (5 a 40 ups). Se encontró que las larvas no lograron sobrevivir en 5 ups al eclosionar, pero su supervivencia aumentó significativamente a partir de los 7 DDE, y los PI oscilaron de 342.1, a 355.9 mOsm.kg⁻¹ con patrones de hiperosmorregulación en salinidades bajas y de hiposmorregulación en altas a

partir de los 7 DDE. *S. annulatus* es un osmorregulador fuerte y posee una gran capacidad para aclimatarse a salinidades desde 10 a 41 ups, sin embargo, puede desarrollarse mejor a partir de 19 ups.

Palabras clave: Híper-osmorregulación, hipo-osmorregulación, punto isosmótico, presión osmótica, expresión de la ATPasa Na^+/K^+ , sobrevivencia, larvas, mortalidad, tiempo de eclosión, *Tetraodontidae*.

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

OSMOREGULACION EN EL BOTETE DIANA *Sphoeroides*
annulatus DURANTE SU DESARROLLO ONTOGENICO Y PRIMER
ESTADIO JUVENIL

T E S I S

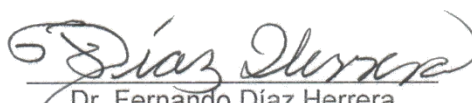
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

JAVIER PEREZ ROBLES

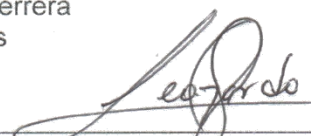
Aprobada por:



Dr. Fernando Díaz Herrera
Director de tesis



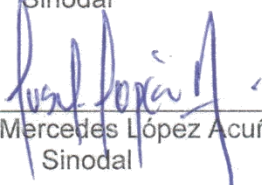
Dra. Ivone Giffard Mena
Sinodal



Dr. Leonardo Ibarra Castro
Sinodal



Dra. Denise Re Araujo
Sinodal



Dra. Lus Mercedes López Acuña
Sinodal



Dr. Thomas Gunter Kretzschmar
Sinodal

DEDICATORIA

Con cariño para mis amigos;

Carmen, Nacho, Karla, Oscar, y Alberto; quienes se convirtieron en mi familia durante mi estancia en Ensenada y han estado conmigo en las buenas y en las malas...

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada durante mi doctorado, y por el apoyo brindado para la movilidad académica.

A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), por la ayuda brindado durante estos tres años, y por el apoyo proporcionado para la movilidad académica.

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO), a la Facultad de Ciencias Marinas (FCM) y al Laboratorio de Ecología Molecular “Dr. Jorge de la Rosa Vélez” por toda la infraestructura y equipo que se necesitó para la elaboración de este trabajo de tesis.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) y por la infraestructura y equipo que se prestó para poder realizar esta tesis.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo AC. (CIAD), unidad Mazatlán, por la infraestructura, equipo, recursos humanos y organismos prestados para la realización de esta tesis.

Al Centro de Reproducción de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES) y al M. en C. Francisco Hoyos Cháirez por la donación de organismos para realizar esta tesis.

A mis directores de tesis; Dr. Fernando Díaz Herrera y a la Dra. Ivone Giffard Mena, por toda la asesoría, ayuda, conocimientos y consejos brindados en todo el proceso de mi doctorado.

A la Dra. Denise Re Araujo y al Dr. Leonardo Ibarra Castro, por haber compartido sus conocimientos, experiencia y ayuda para la realización de esta tesis, además, por haber participado en la revisión de este trabajo.

A mis revisores Dra. Lus Mercedes López Acuña y al Dr. Thomas Gunter Kretzschmar por participar en la revisión de este trabajo de tesis, además, por sus consejos y observaciones para enriquecerlo.

A la M. en C. Luz Estela Rodríguez Ibarra, a la M. en C. Ma. Isabel Abdo-de la Parra, al Biol. Jesús Armando Ibarra Soto, al M. en C. Ángel Humberto Rojo Cebreros, y a la M. P. A Noemi Garcia Aguilar, por toda la asesoría técnica, consejos y ayuda en la realización de los experimentos en el CIAD, Mazatlán.

Al Dr. Luis M. Enríquez Paredes por sus consejos y sugerencias sobre técnicas de biología molecular durante en el trabajo de laboratorio.

A los estudiantes; Juan román Mancillas Bacasegua, Pedro Jesús Soberanes Martínez y Sergio De Jesús Enríquez García, por toda la ayuda brindada en mi estancia en el CIAD, Mazatlán.

CONTENIDO

RESUMEN	i
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS	vi
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
OBJETIVOS	18
GENERAL	18
PARTICULARES	18
CAPITULO I.....	20
Efecto de la salinidad constante sobre el consumo de oxígeno, excreción de amonio, osmorregulación y expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ en juveniles de botete diana.	20
INTRODUCCIÓN.....	21
MATERIAL Y MÉTODOS	25
RESULTADOS	35
DISCUSIONES.....	40
CAPITULO II.....	48
Efecto de salinidades fluctuantes sobre respuestas fisiológicas y metabólicas en el botete diana <i>Spherooides annulatus</i>	48
INTRODUCCIÓN.....	49
MATERIAL Y MÉTODOS	52
RESULTADOS	60
DISCUSIONES.....	66
Principales hallazgos	73
Capitulo III	74
Efecto de la salinidad sobre la osmorregulación durante el desarrollo embrionario del botete diana <i>Spherooides annulatus</i>	74
INTRODUCCIÓN.....	75
MATERIAL Y MÉTODOS	78
RESULTADOS	83
DISCUSIONES.....	91

Principales hallazgos	101
Capítulo IV	102
Osmorregulación y tolerancia a la salinidad en el desarrollo larvario del botete diana <i>Sphoeroides annulatus</i>	102
INTRODUCCIÓN.....	103
MATERIAL Y MÉTODOS	105
RESULTADOS	112
DISCUSIONES.....	132
Principales hallazgos	147
CONCLUSIONES GENERALES	150
PERSPECTIVAS.....	156
BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	158

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Tasa de consumo de oxígeno (TCO), tasa de excreción de amonio (TEA) y la relación atómica oxígeno-nitrógeno (O:N) de juveniles de <i>S. annulatus</i> aclimatados a diferentes salinidades. Los valores son las medias $\pm$ intervalos de confianza.	35
II	Secuencia de nucleótidos encontrada para la ATPasa de Na^+/K^+ de <i>S. annulatus</i> (398 pb) y su traducción a secuencia de aminoácidos.	38
III	Nivel de expresión (media $\pm$ intervalos de confianza) de la ATPasa de Na^+/K^+ branquial de juveniles de <i>S. annulatus</i> , aclimatados a diferentes salinidades.	39
IV	Efecto de la salinidad sobre la eclosión de <i>S. annulatus</i> . Porcentaje de eclosión; PE, porcentaje de sobrevivencia; PS, porcentaje de larvas normales; PN, porcentaje de larvas deformes; PD y tiempo de eclosión; TE, en horas tomadas a partir de la fertilización. Letras diferentes indican diferencias significativas entre salinidades ($P < 0.05$).	84
V	Punto isosmótico de los embriones de <i>S. annulatus</i> en diferentes etapas de su desarrollo. MI; osmolaridad de la sangre, ME; osmolaridad del medio externo. DF, Después de la fertilización. R^2 , índice de regresión lineal de Pearson. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las horas post-fertilización.	86

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación esquemática del cuerpo de <i>S. annulatus</i> adulto.	3
2	Movimiento de iones y agua en teleósteos eurihalinos dulceacuícolas y marinos. A; hiper-osmorregulación en ambiente dulceacuícola, B; hipo-osmorregulación en agua de mar.	6
3	Esquema general de las diferentes estrategias de osmorregulación de peces marinos y de agua dulce comparando la osmolaridad de la sangre con la osmolaridad del agua.	8
4	Representación de las branquias de los teleósteos: A; arcos branquiales, B; Filamentos branquiales, C; lamelas branquiales, D; corte transversal de lamelas branquiales, los espacios huecos son los lugares de ubicación de las células MR. E; esquema general del transporte de iones efectuado por una célula MR o colorcito en los teleósteos marinos.	11
5	Esquema del respirómetro con sistema de recirculación semi-abierta que se utilizó para obtener las muestras de agua y medir la TCO y la TEA.	27
6	Sistema para la toma de muestra de agua y medición de la concentración de oxígeno. Los peces se colocaron en las cámaras de 3000 mL para medir la TCO y la TEA.	28
7	Relación entre la presión osmótica de la sangre con respecto al medio externo en juveniles de <i>S. annulatus</i> expuesto a diferentes. Los puntos indican los valores medios. La línea punteada de 45° representa la isosmolaridad.	36
8	Capacidad osmorreguladora de juveniles de <i>S. annulatus</i> . Los valores positivos indica un patrón de hiperosmorregulación, y los valores negativos indican un patrón de hiposmorregulación.	37

9	Nivel de expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ branquial de <i>S. annulatus</i> basado en el número de copias de ARNm en las diferentes salinidades experimentales. Se representan los valores medios $\pm$ los intervalos de confianza. Las diferentes letras indican las diferencias significativas encontradas ($P < 0.05$).	39
10	Representación esquemática del procedimiento que se siguió para medir las variables objetivo disminuyendo y aumentando la salinidad. Los organismos permanecieron 3 horas en cada salinidad. A los peces mantenidos en el tanque también se sometieron a los cambios fluctuantes de salinidad al mismo tiempo que los colocados en el respirómetro.	55
11	Efecto de las salinidades fluctuantes sobre: a) tasa de consumo de oxígeno (TCO), b); tasa de excreción de amonio (TEA) y c) relación atómica oxígeno-nitrógeno (O:N) en juveniles de <i>S. annulatus</i> (media $\pm$ DE). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las salinidades ($P < 0.05$) y la flechas ($\downarrow\uparrow$) indican la dirección de disminución y aumento de la salinidad. N=183.	61
12	Relación entre la osmolaridad del medio interno de <i>S. annulatus</i> con la del medio externo al ser sometido a variaciones de salinidad. La línea de 45° indica la isosmolaridad. MI; medio interno, ME; medio externo. Las flechas ($\downarrow\uparrow$) indican la dirección de disminución y aumento de la salinidad. N=183.	63
13	Capacidad osmorreguladora de juveniles de <i>S. annulatus</i> sometido a cambios de salinidad. Valores positivos indican un patrón de osmorregulación hiperosmótico, y valores negativos indican un patrón de osmorregulación hiposmótico. Las letras diferentes indican las diferencias significativas entre medias. Las flechas ($\downarrow\uparrow$) indican la dirección de disminución y aumento de la salinidad. N=183.	64
14	Nivel de expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ de <i>S. annulatus</i> basado en el número de copias de ARNm, al ser sometido a cambios graduales de salinidad (media $\pm$ DE). Las diferentes letras indican las diferencias significativas entre medias. Las flechas ($\downarrow\uparrow$) indican la dirección de disminución y aumento de la salinidad. N=90.	65

15	Patrones de osmorregulación de embriones desde la fecundación (hora 0) hasta el inicio de la eclosión (hora 47). La línea de 45 ° representa la isosmolaridad.	85
16	Comportamiento de la osmolaridad de los embriones en cada salinidad de prueba tomando en cuenta el tiempo post-fertilización.	87
17	Capacidad osmorreguladora de los embriones de <i>S. annulatus</i> en cada etapa del desarrollo analizada. A; 16 h DDF, B; 21 h DDF, C; 27 h DDF, D; 36 h DDF, E; 45 h DDF, F; 47 h DDF (2 horas después de la eclosión). DDF, después de la fertilización. Letras diferentes indican diferencias significativas entre salinidades ($P > 0.05$).	88
18	Diferencias morfológicas en el desarrollo embrionario de <i>S. annulatus</i> . Panel I; desarrollo a 35 ups: A, embriones en el momento de la eclosión (45 HDF), B, larva recién eclosionada (47 HDF). Panel II; desarrollo a 5 ups: C, embriones a punto de eclosionar (50 HDF), D, larva deforme recién eclosionada (54 HDF). HDF, horas post-fertilización, las flechas indican las malformaciones.	90
19	Crecimiento de las larvas post-eclosión por efecto de la salinidad a temperatura constante (28 ± 0.5 °C). E; eclosión, AP; apertura de la boca, DDE; días después de la eclosión. Las letras diferentes indican las diferencias significativas encontradas ($P < 0.05$). N=951.	113
20	Efecto de la salinidad sobre los porcentajes de sobrevivencia en cada etapa del desarrollo larvario estudiada. E; eclosión, AP; apertura de la boca, DDE; días después de la eclosión. En la salinidad de 5 ups la sobrevivencia fue del 0%.	115
21	Comparación de las presiones osmóticas de la sangre de las larvas en diferentes estadios del desarrollo embrionario con respecto a las presiones osmóticas del agua de cultivo, a temperatura constante (28 ± 0.5). E; eclosión, AP; apertura de la boca, DDE; días después de la eclosión. La línea de 45° representa la isosmolaridad.	117
22	Efecto de la salinidad sobre las presiones osmóticas de la sangre de larvas de <i>S. annulatus</i> en diferentes estadios de	118

desarrollo. E; eclosión, AP; apertura de la boca, DDE; días 120después de la eclosión.

- | | | |
|----|--|-----|
| 23 | Capacidad osmorreguladora de las larvas de <i>S. annulatus</i> en diferentes etapas de su desarrollo larvario. Los valores positivos indican un comportamiento de hiperosmorregulación y los valores negativos un comportamiento de hiposmorregulación. E; eclosión, AP; apertura de la boca, DDE; días después de la eclosión. Las letras diferentes indican las diferencias significativas encontradas ($P < 0.05$). N=446. | 120 |
| 24 | Porcentajes de sobrevivencia de las larvas en diferentes estadios de su desarrollo larvario en cambios bruscos de salinidad. DDE; días después de la eclosión. Las larvas de 14, 21 y 28 DDE presentaron una supervivencia del 100 %. N=5,585. | 123 |
| 25 | Comparación entre las presiones osmóticas de las larvas en diferentes estadios de su desarrollo con las presiones osmóticas del agua en las salinidades probadas durante las 72 horas en las que duró el experimento; a) eclosión, b) apertura de la boca, c) 7 días después de la eclosión (DDE), d) 14 DDE, e) 21 DDE y f) 28 DDE. La línea de 45° representa a la isosmolaridad. | 126 |
| 26 | Capacidad osmorreguladora de larvas de <i>S. annulatus</i> en diferentes etapas de su desarrollo sometidas a cambios repentinos de salinidad en las 72 horas que duró el experimento. a) eclosión, b) apertura de la boca, c) 7 días después de la eclosión (DDE), d) 14 DDE, e) 21 DDE y f) 28 DDE. Los valores positivos indican un comportamiento de hiperosmorregulación y los valores negativos un comportamiento de hiposmorregulación. Las letras diferentes indican las diferencias significativas encontradas ($P < 0.05$). | 129 |
| 27 | Crecimiento de las larvas post-eclosión a 35 ups en los dos experimentos realizados en este estudio. Protocolo 1; experimento A, protocolo 2; experimento B. | 131 |

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los estuarios son ecosistemas muy importantes para el ciclo de vida de muchas especies de peces, estos ambientes poseen una gran riqueza de flora y fauna, además son de importancia ecológica y comercial, ya que en estos lugares crecen y se desarrollan especies que tienen gran potencial para la acuicultura (Roldán-Pérez y Ramírez-Restrepo, 2008). Estos ambientes están influenciados por los ciclos mareales, y por el flujo de agua dulce proveniente de los ríos y/o arroyos, esto hace que sean lugares dinámicos en donde ocurren variaciones de temperatura, salinidad y de oxígeno. Además, la evaporación en la temporada de secas puede hacer que la salinidad de estos cuerpos de agua aumente considerablemente, de igual manera, las lluvias y el aporte de los ríos puede hacer que la salinidad baje rápidamente (Álvarez-Cadena et al, 1987). La fauna que habita estos sistemas tiene la capacidad de tolerar las variaciones físico-químicas que se presentan, aquí convergen especies de peces de origen marino (estenohalinos y eurihalinos), estuarinos y dulceacuícolas. **Los peces** son un grupo de organismos importantes para los sistemas lagunares-estuarinos debido a su rol ecológico en las redes tróficas, además, son de gran importancia económica para el hombre, por lo que es necesario conocer su biología, ecología, fisiología y comprender los mecanismos que utilizan para habitar este tipo de ambientes (Val et al, 2006).

El botete diana *Sphoeroides annulatus*, (Jenyns 1842) es un teleósteo marino que habita las zonas costeras y estuarinas, pertenece a la familia *Tetraodontidae*, que agrupa alrededor de 120 especies de peces, la mayoría son marinos y

pueden ser encontrados en aguas tropicales y subtropicales de los océanos del mundo. Tienen la cabeza grande y obtusa, mandíbulas en forma de pico (constituida por cuatro dientes grandes y fuertes, dos en cada mandíbula); aberturas branquiales sin opérculos o solapas dérmicas. Las aletas dorsal y anal se encuentran en una posición muy posterior, no tienen espinas, y las aletas pélvicas están ausentes (Figura 1).

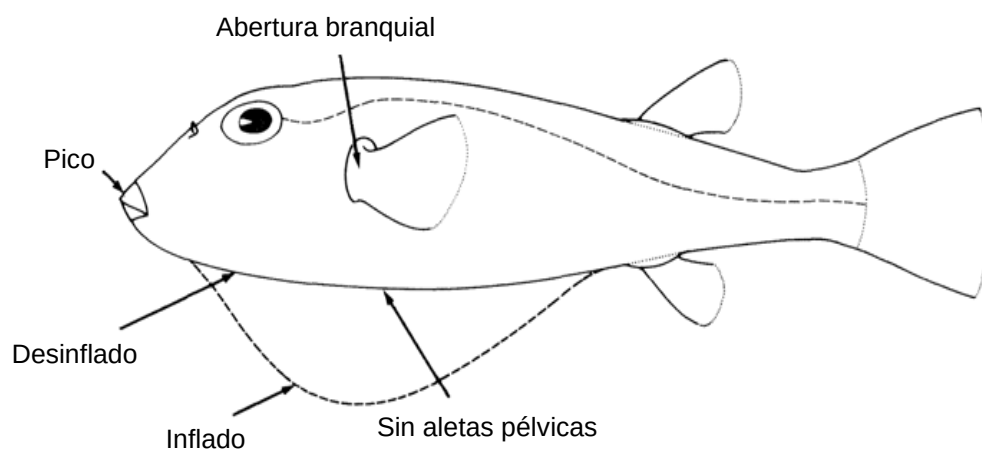


Figura 1. Representación esquemática del cuerpo de *S. annulatus* adulto. Tomado de (FAO, 1995).

Los peces de esta familia no presentan escamas dérmicas y las líneas laterales no están bien definidas (FAO, 1995). Esta especie se puede encontrar en aguas someras y zonas arenosas, es común encontrarlo dentro de esteros, lagunas costeras, manglares y en áreas cerca de las desembocaduras de ríos (Chávez-Sánchez et al, 2008). En su ambiente natural y durante todos sus estadios de

vida se enfrenta a fluctuaciones de salinidad, ya que los adultos migran a estos sistemas lagunares-estuarinos de abril a junio para desovar, los juveniles se mantienen en estas áreas para alimentarse y posteriormente migran hacia aguas costeras (Álvarez-Cadena et al, 1987; Castro-Aguirre et al, 1999; Sánchez-Cárdenas et al, 2011; Blaber, 2012; Komar et al, 2004). El botete diana se distribuye desde San Diego California hasta Pisco, Perú y las islas Galápagos, e inclusive es muy común encontrarlo en el Golfo de California, por lo que puede ser encontrado en todo el litoral del Pacífico Mexicano, en algunas áreas, es tan abundante que es común que sea atrapado por redes de arrastre sobre sustratos blandos (FAO, 1995; Castro-Aguirre et al, 1999).

En México el cultivo y consumo de botete frecuentemente en los estados de Sinaloa, Sonora y Baja California, la exportación ha ido en aumento. En el estado de Sinaloa, en el 2000 se produjeron 147.6 toneladas con un valor superior a los \$226,600 USD, en esta zona los peces se cultivan de manera semi-intensiva utilizando sistemas de recirculación (Chávez-Sánchez et al, 2008). Desde 1996 se comenzaron a realizar estudios enfocados a la crianza, reproducción, alimentación y desarrollo del botete diana, principalmente en el Centro de Investigación para la Alimentación y Desarrollo (CIAD) en Mazatlán, Sinaloa, México, y en el Centro de Reproducción de Especies Marinas del estado de Sonora (CREMES). En el 2008 se logró avanzar sobre su reproducción y cultivo (Chávez-Sánchez et al, 2008). Se considera a esta especie como de alto valor comercial y el precio por kilogramo es aproximadamente de \$125.00 m.n., la

carne posee un color claro, textura blanda y muy buen sabor. Su demanda en el mercado está en aumento, posee potencial para exportación principalmente a Estados Unidos y a Asia en donde el consumo de peces globo es mayor y está ampliamente difundido principalmente en países como Japón y Corea (Arias-Rodríguez et al, 2004a; Sánchez-Cárdenas et al, 2007; Chávez-Sánchez et al, 2008).

Al igual que otras especies de teleósteos que habita en las zonas costeras y los estuarios, *S. annulatus* posee **mecanismos fisiológicos** para regular la presión osmótica de sus fluidos internos (sangre, principalmente) y así mantener un balance de iones dentro de sus rangos fisiológicos tolerables. Esta capacidad de regulación osmótica es de suma importancia para evitar la deshidratación o dilución de los fluidos corporales en aguas de baja salinidad. Los fluidos internos (sangre) de los peces de agua dulce presentan una mayor concentración de iones con respecto al medio externo que habitan, en cambio, los peces de origen marino tienen un medio interno más diluido con respecto al agua de mar. En la Figura 2 se muestra este fenómeno; en agua dulce en dónde hay baja concentración de iones, los peces deben mantener su presión osmótica de $\approx 300 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ y debido a que la presión osmótica del agua es menor de $\approx 5 \text{ mOsm.kg}^{-1}$, por lo tanto, el agua entra de manera pasiva por la piel y las branquias, por lo que los peces tienen que incorporar iones por transporte activo por medio de las branquias, también producen una orina muy diluida, además, pueden ganar algunos iones por medio de la comida, y así poder mantener la

concentración de iones constante en la sangre. En cambio, los peces osmorreguladores marinos presentan una presión osmótica de $\approx 400 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ y como la presión osmótica del agua de mar es de $\approx 1000 \text{ mOsm.kg}^{-1}$, los peces pierden agua por medio de la piel y las branquias, por esta razón, excretan iones monovalentes como Na^+ y Cl^- de manera activa por medio de células especializadas ubicadas en las branquias, además, producen una orina concentrada en iones divalentes (Mg^{2+} , SO_4^{2-}), también, pueden perder iones divalentes en las heces (Marshall y Grosell, 2006).

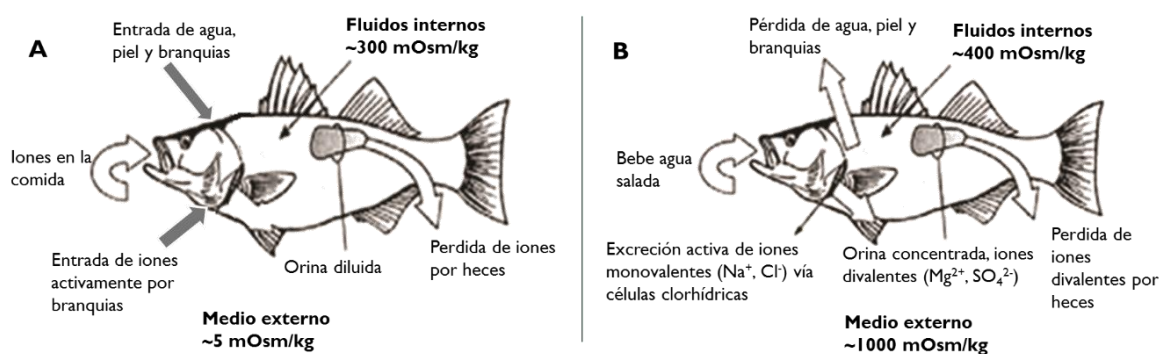


Figura 2. Movimiento de iones y agua en teleósteos eurihalinos dulceacuícolas y marinos. A; híper-osmorregulación en ambiente dulceacuícola, B; hipo-osmorregulación en agua de mar. Adaptado de Marshall y Grosell, (2006).

La regulación de la concentración de estos iones en peces adultos es efectuada principalmente por las **branquias, el riñón, el tubo digestivo y la piel** en menor escala (Evans et al, 1999; Marshall y Grosell, 2006; Evans, 2010). Los teleósteos marinos tienen una presión osmótica (PO) de alrededor de 370 a 480

mOsm.kg⁻¹, lo que hace que el agua tienda a salir por transporte pasivo del interior de los peces al medio externo y particularmente los iones de Na⁺ y Cl⁻. Esto requiere de una regulación activa para que los peces puedan mantener sus fluidos internos en condiciones fisiológicas óptimas (Evans, 2010; Lavery y Skadhauge, 2012). Para manejar la composición de los fluidos extracelulares, los peces han desarrollado tres estrategias fundamentales: 1) Osmoconformidad, cuando los peces mantienen la osmolaridad de su plasma en igual concentración a la de su medio; 2) hiper-osmorregulación, cuando los peces mantienen la concentración de iones de sus fluidos corporales en mayor concentración a la de su medio; y 3) hipo-osmorregulación, cuando el fluido corporal es regulado para mantener un nivel osmótico más bajo con respecto a su medio (Figura 3) (Marshall y Grosell, 2006). Debido a esto, la **salinidad** puede afectar al crecimiento, ya que influye sobre el costo energético que los peces invierten para la regulación iónica y osmótica (Arjona et al, 2009). Los peces osmorreguladores necesitan invertir energía para efectuar los ajustes osmóticos necesarios, esto es conocido como trabajo osmótico. Los peces osmoconformadores se benefician de no gastar recursos metabólicos en la osmorregulación, su medio interno se mantiene en igualdad osmótica con la del medio externo presentando una alta permeabilidad osmótica ($\sim 1.28 \text{ cm s}^{-1} \times 10^{-4}$) comparado con los teleósteos marinos ($\sim 0.074 \text{ a } 0.29 \text{ cm s}^{-1} \times 10^{-4}$) (Marshall y Grosell, 2006).

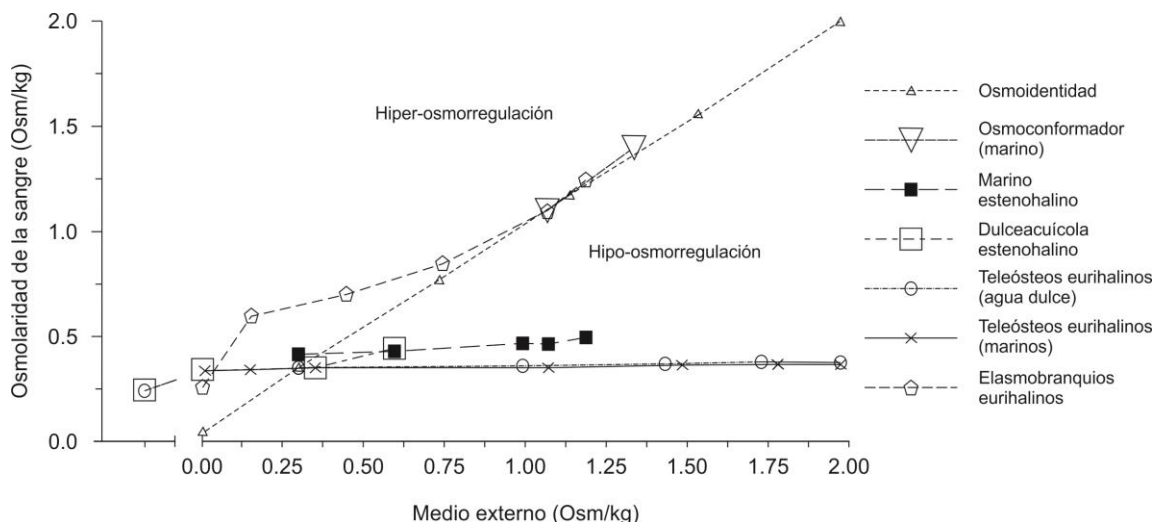


Figura 3. Esquema general de las diferentes estrategias de osmorregulación de peces marinos y de agua dulce comparando la osmolaridad de la sangre con la osmolaridad del agua. Adaptado de (Marshall y Grosell, 2006).

Los teleósteos marinos necesitan regular activamente la osmolaridad de su medio interno para poder mantener una concentración interna menor que la del medio exterior, ya que la osmolaridad del agua de mar es de aproximadamente $1000 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ y la del medio interno debe mantenerse alrededor de los 400 mOsm.kg^{-1} (Bond, 1996). Para esto, los peces poseen adaptaciones especiales, las cuales han sido adquiridas durante su proceso evolutivo. Los teleósteos adultos ya cuentan con todas estas adaptaciones y capacidades para mantener la concentración de sus fluidos internos en un nivel fisiológico estable y generalmente están equipados por un par de branquias. Siendo las branquias el principal órgano osmorregulador. Cada branquia consiste de un arco branquial, filamentos y lamelas. De cada arco branquial salen dos filamentos en donde se encuentran las lamelas branquiales en cuyo epitelio se encuentran las células

MR especializadas en los procesos de osmorregulación. Estas células, también llamadas clorocitos o ionocitos se encuentran en el epitelio de las lamelas branquiales, y se especializan en excretar NaCl de manera activa invirtiendo energía en la osmorregulación, para ello utilizan principalmente a la enzima **ATPasa de Na^+/K^+** y el co-transportador iónico de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$; además, presentan grandes cantidades de estos transportadores en sus membranas, reflejando su extraordinaria capacidad de regulación (Figura 4) (Evans, 2010; Hirose et al, 2003). También, el mantenimiento del equilibrio ácido-base implica el balance de los iones H^+ y HCO_3^- que está relacionado con el movimiento de Na^+ y Cl^- . En los teleósteos marinos los transportadores apicales de Na^+/H^+ y $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ de las branquias mantienen este equilibrio. Mientras que la excreción de sal se efectúa por co-transportadores de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}_2^-$, y por canales de Cl^- que hacen que Na^+ salga atravesando las uniones celulares. La ATPasa de Na^+/K^+ es una enzima transmembranal y su trabajo es mantener la concentración intracelular del Na^+ . Además, mantiene las concentraciones fisiológicas óptimas de K^+ en las células (Figura 4). Para llevar a cabo esta actividad, la ATPasa de Na^+/K^+ posee dos conformaciones; E1 y E2. En su conformación E1, esta enzima tiene tres sitios de unión de Na^+ de alta afinidad y dos sitios fijadores de K^+ de baja afinidad accesibles a la superficie citosólica de la proteína. La K_m para la fijación de Na^+ a estos sitios citosólicos es de 0.6 mM, un valor considerablemente más bajo que la concentración intracelular de Na^+ de ≈ 12 mM; como resultado, los iones de Na^+ normalmente ocuparan por completo estos sitios. Por lo contrario, la afinidad de los sitios de fijación de K^+ es lo

suficientemente baja como para que los iones de K^+ , transportados hacia el interior a través de la proteína, se disocien de E1 hacia el citosol a pesar de la alta concentración intracelular de K^+ . Durante la transición de E1 a E2, los tres iones de Na^+ fijados se vuelven accesibles a la cara exoplasmática y simultáneamente se reduce la afinidad de los tres sitios de fijación de Na^+ . Los tres iones de Na^+ transportados hacia afuera a través de la proteína y ahora unidos a los sitios de Na^+ de baja afinidad expuestos a la cara exoplasmática, se disocian de uno a la vez hacia el medio extracelular a pesar de la alta concentración extracelular de Na^+ . La transición a la conformación E2 también genera dos sitios K^+ de alta afinidad accesibles a la cara exoplasmática. Como la K_m para la fijación de K^+ a estos sitios (0.2 mM) es más baja que la concentración extracelular de K^+ (4 mM), estos sitios se llenarán de iones K^+ . De manera similar, durante la transición de E2 a E1, los dos iones K^+ fijados son transportados hacia el interior y luego liberados dentro del citosol (Scheiner-Bobis, 2002; Lodish et al, 2005).

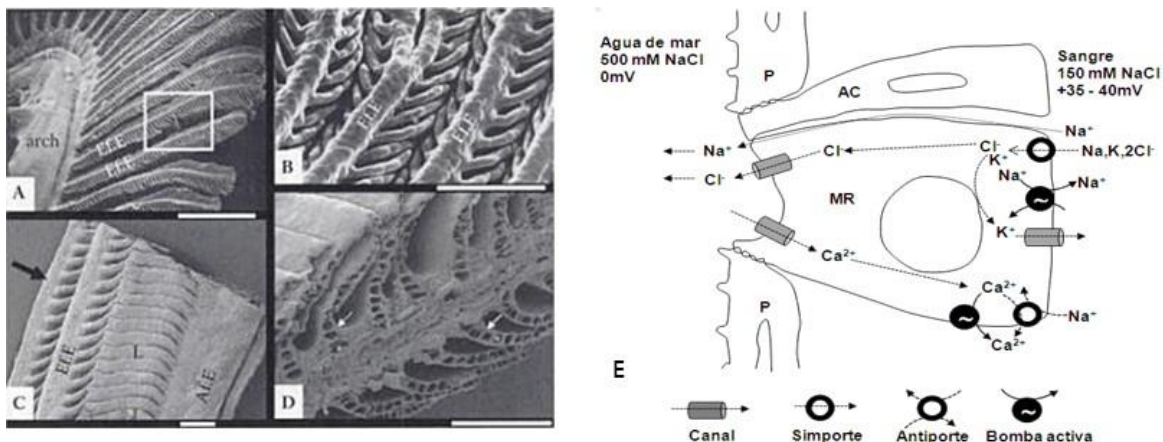


Figura 4. Representación de las branquias de los teleósteos: A; arcos branquiales, B; Filamentos branquiales, C; lamelas branquiales, D; corte transversal de lamelas branquiales, los espacios huecos son los lugares de ubicación de las células MR. E; esquema general del transporte de iones efectuado por una célula MR o colorcito en los teleósteos marinos. (Evans et al, 2005; Marshall y Grosell, 2006)

No solo las células branquiales son las responsables de efectuar los procesos de osmorregulación, también existen otros órganos que participan en las funciones osmorreguladoras de los peces marinos y de agua dulce, como la piel y membrana opercular, el riñón, tracto gastrointestinal, la vejiga urinaria, y la glándula rectal en el caso de los elasmobranquios (Marshall y Grosell, 2006; Claiborne et al, 2008).

En muchos teleósteos, la capacidad osmorreguladora no es igual en las diferentes etapas de su desarrollo ontogénico, por ejemplo; durante del desarrollo embrionario están ocurriendo procesos que finalmente dan lugar a la diferenciación de los sistemas de tejidos y órganos esenciales para la homeóstasis en el organismo (Hall, 2010). A pesar de que los embriones carecen de los órganos osmorreguladores de los adultos, definitivamente poseen una

clara habilidad osmorreguladora y ha sido estudiada en distintas especies, por ejemplo; en agua dulce donde ocurre el desarrollo embrionario del salmón, la osmolaridad de la sangre se mantiene de 360-370 mOsm.kg⁻¹ y se ha verificado que en los adultos esta alrededor de los 300 mOsm.kg⁻¹, esto es típico de un comportamiento de hiper-osmorregulación (Kaneko et al, 2002). Por otro lado, en la mayoría de las especies de teleósteos la principal función de las branquias son los procesos de intercambio gaseoso y de osmorregulación después de la eclosión (Kaneko y Hiroi, 2008). Se tiene evidencia de que el comportamiento osmorregulador y la capacidad osmorreguladora de los peces eurihalinos durante su ontogenia considerando el desarrollo embrionario, desarrollo larvario, las etapas de juvenil y adulta no son iguales (Fridman et al, 2012a; Fridman et al, 2012b; Bodinier et al, 2010b; Yang y Chen, 2006; Varsamos et al, 2005). Además, se considera que la salinidad es un factor importante para la incubación de los huevos al afectar directamente el desarrollo embrionario ya que puede retardar el tiempo y porcentaje de eclosión, además de producir malformaciones en las larvas recién eclosionadas (Zhang et al, 2010; Fridman et al, 2012a; Abdo-de la Parra et al, 2012). Además, las larvas de los peces que desovan en ambientes donde ocurren cambios frecuentes de salinidad, pueden soportar dichos cambios de salinidad y temperatura, esto lo pueden lograr por adaptaciones importantes como el desarrollo de células especializadas en la osmorregulación (ionocitos), las cuales son más abundantes en órganos enfocados a la osmorregulación, como las branquias, piel, riñón y tracto digestivo (Kato et al, 2000; Kaneko et al, 2002; Varsamos et al, 2002; Sucré et al, 2011).

Sin embargo, durante las etapas tempranas del desarrollo larvario; las branquias no están bien desarrolladas y la piel funciona como principal órgano osmorregulador (Bodinier et al, 2010b).

La salinidad no es la única variable que puede afectar el desarrollo de los peces en sus hábitats, existen otras **variables ambientales**; como la disponibilidad de O₂, y a su vez, estas variables dependen de otros factores ambientales como la temperatura, estación, materia orgánica, pH, y CO₂ disuelto, afectando a la demanda de O₂ de los organismos. El oxígeno disuelto disminuye por acción de la respiración de los organismos acuáticos, y es agregado por difusión a partir de la atmosfera, y por la fotosíntesis de los productores primarios. Dependiendo del balance entre la producción de O₂ y la respiración, el agua poco profunda puede ser hiperoxia (alta saturación de O₂) durante el día, hipóxica (baja concentración de O₂) o totalmente carente de oxígeno (anóxica) durante la noche. Aunque todos los vertebrados requieren el O₂ para efectuar sus procesos metabólicos, los peces poseen el sistema de adaptación más diverso en cuanto la función y morfología debido a las propiedades del agua (Tran-Duy et al, 2008; Cerezo Valverde et al, 2006; Methling et al, 2010).

La salinidad y la temperatura son los **factores abióticos** más importantes que influyen en el metabolismo de los organismos acuáticos. Los cambios en la salinidad del medio modifican directamente los mecanismos de osmorregulación de los peces y su efecto se refleja en el consumo de oxígeno y excreción nitrogenada (Salvato et al, 2001; Zheng et al, 2008). Con respecto a esto, está

bien documentado que la energía que invierten los peces eurihalinos se ve reflejada en un aumento en la demanda de oxígeno y excreción de amonio (Nordlie, 1978; Plaut, 2000; Foss et al, 2001; Gracia-López et al, 2006; Zheng et al, 2008). El oxígeno que consumen los peces es indicador de la tasa metabólica; las mediciones de la tasa de consumo de oxígeno (TCO) son usadas para examinar que tanta energía es usada para compensar el estrés en los organismos acuáticos. La TCO puede ser usada para determinar cómo las condiciones ambientales afectan a la ganancia de peso neto de los organismos (Shi et al, 2011).

En algunas especies, la TCO se incrementa al incrementar la salinidad, pero en otras especies como *Micropogonias furnieri* los valores más bajos de la TCO ocurren en la salinidades en donde para esta especie se encuentra su punto isosmótico (Moser y Hettler, 1989; Aristizabal Abud, 1992). Tanto la TCO como la tasa de excreción de amonio (TEA) pueden ser usadas como indicadores del gasto energético que los peces realizan en los procesos de osmorregulación. La TEA está directamente relacionada con el catabolismo de las proteínas, el 80% de la excreción de amonio es debida a estos procesos catabólicos (da Silva Rocha et al, 2005). La excreción de amonio, entonteces, puede ser usada como un indicador del efecto del ambiente sobre el metabolismo de las proteínas (Altinok y Grizzle, 2003). El efecto de la salinidad sobre la excreción de amonio en los peces marinos en muchas ocasiones pueden ser confusos, esto se debe a las diferencias específicas en el comportamiento metabólico de cada especie

(Haney y Nordlie, 1997a). Sin embargo, se ha reiterado que los peces que viven en entornos en los que hay cambios de salinidad interanuales son más capaces de sobrevivir a las fluctuaciones de salinidad (Plaut, 2000). Además, con los datos de la TCO y a la TEA se puede obtener la relación oxígeno-nitrógeno (O:N), cuyo análisis provee información sobre qué tipo de sustrato es empleado para obtener energía en los procesos metabólicos. Con esta información se puede esclarecer si la salinidad ejerce un efecto significativo sobre la demanda energética en los peces, además, se puede inferir el nivel de estrés.

Por otro lado, la mayoría de los peces eurihalinos que son capaces de tolerar un amplio rango de salinidad adquieren sus habilidades de osmorregulación durante **etapas tempranas de su desarrollo**. En este sentido, los patrones de osmorregulación están acoplados a los cambios que puedan ocurrir durante el desarrollo ontogénico; un proceso que puede ser gradual, en el cual, ocurren cambios morfológicos, anatómicos, fisiológicos y de comportamiento (Varsamos et al, 2005; Koumoundouros et al, 2009; Brauner y Rombough, 2012). A un **nivel celular**, esto requiere de modificaciones de las actividades celulares de manera estructurada y ordenada.

Es importante realizar estudios multidisciplinarios para desarrollar estrategias de cultivo adecuadas que permitan el aprovechamiento de especies con potencial para la acuicultura. Debido a que las pesquerías en México enfrentan una crisis por la sobrepesca, cambios ambientales y por la sobrepoblación humana; la maricultura puede ser una opción para minimizar estos problemas y poder

incrementar la producción de alimentos para cubrir la demanda. Sin embargo, la **maricultura** se ha centrado en pocas especies de peces, camarones y bivalvos, pero recientemente ha surgido la necesidad de cultivar otras especies y de esta forma diversificar los cultivos. Por esta razón es importante evaluar el potencial acuícola de diferentes especies nativas (Chávez-Sánchez et al, 2008). En este sentido, los estudios fisiológicos aportan información importante para optimizar las condiciones de cultivo, ya que los efectos de la salinidad sobre el consumo de oxígeno se reflejan en la tasa metabólica y por ende en el desarrollo y crecimiento adecuado de los organismos acuáticos. Además, los criterios más importantes para determinar si una especie tiene el potencial para la acuicultura son; alto valor en el mercado y una alta tolerancia a cambios de salinidad y temperatura (Chávez-Sánchez et al, 2008; Reyes et al, 2011). A pesar que *S. annulatus* es una especie que ya ha sido señalada como eurihalina por Pérez-Robles et al, (2012), es necesario conocer desde que etapa del desarrollo presenta dicha capacidad y cuáles son sus respuestas fisiológicas ante, el efecto de la salinidad y así contar con más elementos que permitan optimizar sus condiciones de cultivo y mejorar su producción acuícola. Por lo que en este trabajo se pretende determinar el grado de eurihalinidad de *Sphoeroides annulatus* así como identificar específicamente los niveles fisiológicos de su concentración osmótica del plasma sanguíneo, tomando en cuenta variables como la TCO, la TEA, la expresión de la enzima ATPasa de Na^+/K^+ , además, se revisa el efecto de la salinidad sobre la sobrevivencia, crecimiento, y deformaciones en diferentes etapas del desarrollo ontogénico, de igual modo, se

analiza el efecto a cambios bruscos y graduales de salinidad sobre estas variables.

OBJETIVOS

GENERAL

Analizar el efecto de la salinidad sobre respuestas fisiológicas y metabólicas del botete diana *Sphoeroides annulatus* durante ciertas etapas de su desarrollo.

PARTICULARES

- Revisar el efecto de la salinidad constante y fluctuante sobre la tasa de consumo de oxígeno (TCO), la tasa de excreción de amonio (TEA), la relación atómica Oxígeno:Nitrógeno (O:N) y la expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ en juveniles de *S. annulatus*.
- Determinar los patrones y capacidades de osmorregulación en embriones, larvas y juveniles de *S. annulatus* al ser expuestos a salinidades constantes y a cambios bruscos de salinidad.
- Evaluar el efecto de la salinidad constante sobre el tiempo de eclosión, porcentaje de supervivencia, porcentaje de eclosión, e incidencia de larvas deformes durante el desarrollo embrionario.
- Determinar el efecto de la salinidad sobre el crecimiento, supervivencia e incidencia de malformaciones en diferentes estadios del desarrollo larvario.

- Analizar el efecto de cambios bruscos de salinidad sobre la supervivencia de larvas de botete diana desde la eclosión hasta la etapa de juvenil.
- Ligar las respuestas fisiológicas del botete ante diferentes salinidades y en sus diferentes etapas de desarrollo ontogénico para generar información nueva que permita mejorar las condiciones y técnicas de cultivo.

CAPITULO I

Efecto de la salinidad constante sobre el consumo de oxígeno, excreción de amonio, osmorregulación y expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ en juveniles de botete diana.

INTRODUCCIÓN

El botete diana ha sido considerado como una especie eurihalina, a pesar de los escasos estudios científicos que respalden estas aseveraciones. Estas declaraciones se basan en la capacidad que tiene esta especie para sobrevivir en ambientes de bajas y en altas salinidades. Actualmente este tipo de características son aprovechadas en la acuicultura, pero el conocimiento general sobre la fisiología de la osmorregulación en el botete diana es todavía escaso y se basa en sólo observaciones (Chávez-Sánchez et al, 2008).

Se han realizado algunos estudios enfocados a la fisiología de esta especie, como el hecho por Reyes et al, (2011) dónde se evaluó el efecto de la temperatura de aclimatación, sobre la temperatura preferida, termotolerancia y consumo de oxígeno en *S. annulatus*. Se probaron seis temperaturas de aclimatación (19, 22, 25, 28 y 31 °C), utilizando el método agudo y la temperatura crítica máxima (TCM) se logró concluir en base a la TCO que la temperatura preferida es a 26 °C. Otros trabajos han señalado que esta especie crece favorablemente a 28 °C (Abdo-de la Parra et al, 2010; Abdo-de la Parra et al, 2012).

Se han realizado algunos trabajos ecofisiológicos con otras especies de la familia *Tetraodontidae*; como el realizado por Yan et al, (2004) en donde se revisó el efecto de la salinidad sobre el crecimiento y sobrevivencia en *Fugu obscurus* a una temperatura constante (22 °C). Posteriormente Prodócimo y Freire, (2006)

realizaron un estudio con *S. testudineus* y *S. greeley* con el objetivo de determinar su comportamiento osmorregulador cuando estas especies son sometidas a bajas salinidades. Después Kato et al, (2005) realizaron un estudio sobre el comportamiento osmorregulador con seis especies de peces globo; *Takifugu obscurus*, *T. rubripes*, *T. niphholes*, *T. pardalis*, *T. poecilonotus* y *T. porphyreus*. Más tarde Lee et al, (2005) realizaron un estudio sobre la tolerancia a bajas salinidades en *Takifugu rubripes*, esta especie de pez globo tiene gran importancia comercial en Japón. Posteriormente se realizaron otros trabajos con *T. rubripes* en donde se revisó el efecto de la temperatura, diferentes dietas y la densidad de cultivo sobre el crecimiento (Kikuchi et al, 2006; Kikuchi et al, 2009). También Yang y Chen, (2006) evaluaron la tolerancia de embriones de *T. obscurus* a diferentes salinidades. Posteriormente Zhang et al, (2010) revisaron el efecto de la salinidad sobre larvas y huevos de *T. flavidus* ya que esta especie tiene gran importancia para la acuicultura en China.

Existen diversos trabajos importantes en otros peces estuarinos en donde se revisa el efecto de la salinidad sobre el metabolismo. Ejemplos de ellos son los siguientes: Nordlie, (1978) realizó una investigación sobre el efecto de la salinidad sobre el consumo de oxígeno en *Ambassis interrupta*. Después Mary y Lawrence, (1989) revisaron el efecto de la salinidad y la temperatura sobre el metabolismo de rutina en *Leiostomus xanthurus*. Se determinó la tasa de consumo de oxígeno de rutina (QO_2), y encontraron que al aumentar la temperatura aumentó el QO_2 . Más tarde Aristizabal Abud, (1992) revisó el efecto

de la salinidad y el peso sobre el metabolismo en *Micropogonias furnieri* midiendo la tasa de consumo de oxígeno QO_2 . Nordlie et al, (1992) realizaron un estudio para comparar el comportamiento de osmorregulación y la tolerancia a diferentes salinidades en poblaciones de *Poecilia latipinna*. Posteriormente Wright et al, (1995) cuantificaron la excreción de amonio y urea en *Oligocottus maculosus* por efecto de la reducción de la salinidad. Haney y Nordlie, (1997a) cuantificaron el efecto de la salinidad sobre la tasa metabólica y la tensión crítica de oxígeno en *Cyprinodon variegatus*. Plaut, (2000) realizó un estudio con *Aphanius dispar* evaluando el efecto de diferentes salinidades sobre la tasa metabólica y la velocidad de natación. Sampaio y Bianchini, (2002) analizaron el efecto de la salinidad sobre la osmorregulación y el crecimiento en el pez eurihalino *Paralichthys orbignyanus*. Después, Fiess et al, (2007) evaluaron el efecto de la salinidad y la temperatura sobre la habilidad osmorreguladora, la concentración de osmolitos orgánicos y el perfil de hormonas en plasma sanguíneo en la tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Más tarde Fielder et al, (2007) realizaron un estudio con juveniles de *Pagrus auratus* evaluando el efecto de la salinidad sobre la osmorregulación y la morfología de los clorocitos. Después Zheng et al, (2008) revisaron el efecto de la temperatura y la salinidad sobre el consumo de oxígeno y excreción de amonio en juveniles de *Miichthys miiuy*. Arjona et al, (2009) revisaron el efecto de tres salinidades (15, 25 y 39 ppm) sobre el crecimiento, osmorregulación y metabolismo energético en *Solea senegalensis*.

El objetivo de esta investigación en este capítulo es conocer las tasas metabólicas en juveniles de botete diana para determinar los niveles de consumo de oxígeno, excreción de amonio, la relación atómica O:N, la osmorregulación y los niveles de expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ en función de la salinidad. Con los datos obtenidos se identificarán los niveles óptimos de salinidad en los que esta especie podría desarrollarse adecuadamente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este análisis se utilizaron juveniles de *S. annulatus* de un año de edad (peso medio de 128 ± 5.7 g). Los peces se obtuvieron del Centro Reproductor de Especies Marinas del estado de Sonora (CREMES), México. Los organismos fueron transportados al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), y se mantuvieron en invernaderos en el departamento de Biotecnología Marina de esta institución. Los peces ($n = 150$) se cultivaron a una salinidad de 35 ups y a temperatura constante de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, la cual es la temperatura recomendada para esta especie (Reyes et al, 2011). Los organismos se colocaron en tanques de 2000 L de capacidad. Después de una semana, se dividieron en seis grupos de 25 peces y fueron expuestos de manera gradual a las salinidades experimentales (10, 17, 23, 29, 34 y 41 ups), cada grupo fue colocado en tanques de 2000 L y mantenidos en dichas salinidades por 21 días. Las bajas salinidades se prepararon con agua de mar (a 35 ups) y agua dulce previamente dechlorinada y filtrada, las salinidades se ajustaron utilizando un refractómetro de mano (ATAGO® Tokyo, Japan). Para llegar a la salinidad de prueba, cada día se disminuyó la salinidad en 5 ups, y para preparar la salinidad de 41 ups se agregó sal marina al agua de mar.

Cada día se reemplazó aproximadamente el 75% del agua en cada tanque de cultivo con la finalidad de remover el alimento no consumido y desechos, además, para evitar el incremento de nitritos. La salinidad se midió diariamente para

realizar ajustes si lo era necesario y poder compensar los cambios de salinidad que pudieran darse por acción de la evaporación. La temperatura fue controlada mediante un calentador de titanio de 1000 W equipado con un controlador electrónico (Moller CI-K3-125-M, Ensenada, Baja California México).

Los organismos se alimentaron a saciedad por las mañanas y las tardes, para ello se usó una mezcla de alimento comercial balanceado con 45% de proteína y calamar picado de acuerdo a las recomendaciones de Reyes et al, (2011).

La TCO se midió utilizando un respirómetro semi-abierto como el descrito por Díaz et al, (2007), (Figura 5) el respirómetro fue equipado con 21 cámaras de 3000 mL cada una. Posteriormente 21 juveniles de botete diana aclimatados por 21 días a las salinidades de 10, 17, 23, 29, 34 y 41 ups a $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ se colocaron individualmente en cada cámara en el respirómetro por 24 h antes de realizar las mediciones para evitar sesgo causado por el estrés ocasionado por la manipulación de los organismos. Todas las mediciones se realizaron entre las 9:00 y 13:00 horas. Únicamente se utilizaron peces con el peso adecuado (135.0 ± 3.69 g) para minimizar el posible efecto del peso corporal sobre el consumo de oxígeno.

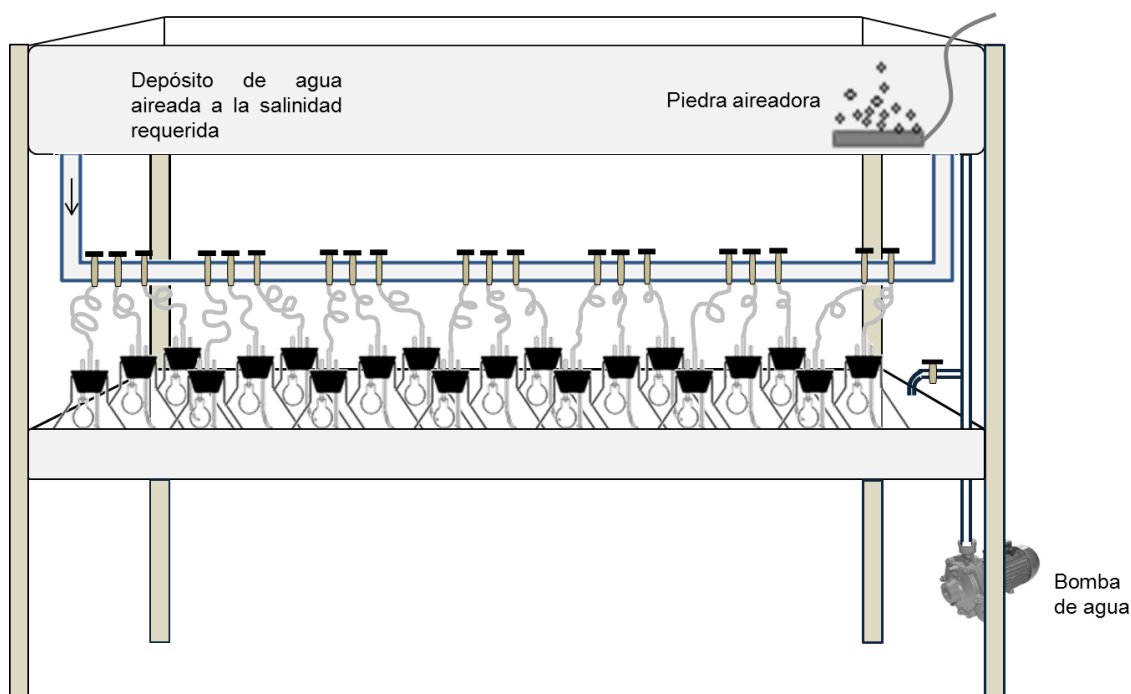


Figura 5. Esquema del respirómetro con sistema de recirculación semi-abierta que se utilizó para obtener las muestras de agua y medir la TCO y la TEA.

Dentro del respirómetro el flujo de agua en el sistema permaneció abierto por dos horas y fue cerrado justo antes de realizar las mediciones de oxígeno. Las muestras de agua se tomaron de cada una de las cámaras donde se colocaron los organismos, cada cámara utilizada constaron de un matraz de 3.0 litros sellado con un tapón de caucho, el cual tiene una válvula en donde se permite la entrada de agua aireada y la salida de agua con baja concentración de oxígeno, además cuenta con una entrada para permitir inflar un globo que desplaza el agua interior del matraz, así, el agua puede salir por la válvula para leer la concentración de oxígeno en la muestra en un oxímetro YSI 52 (Yellor Spring Instruments, Yellow Springs, OH, USA) dotado de un sensor polarográfico (Figura

6). La muestra de agua de 10 mL se colocó dentro de una cámara deacrílico hermética, dentro de dicha cámara se colocó también un agitador magnético para homogenizar (Figura 6). Los peces permanecieron en las cámaras por una hora, ya que de acuerdo con Stern et al, (1984) es el tiempo suficiente para que los niveles de oxígeno disuelto permanezcan del 25 al 30%. Después de reestablecer el flujo de agua, se tomó una muestra de agua para medir la concentración final de oxígeno.

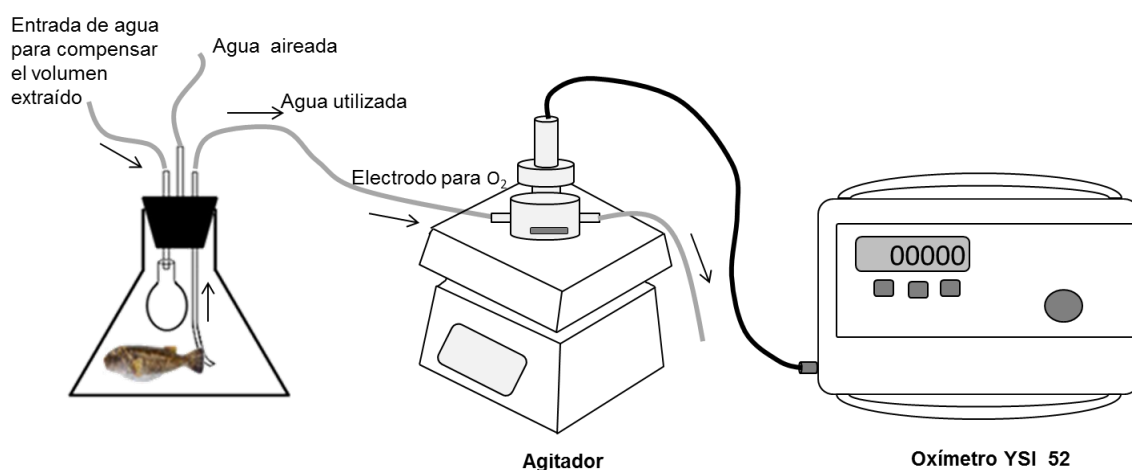


Figura 6. Sistema para la toma de muestra de agua y medición de la concentración de oxígeno. Los peces se colocaron en las cámaras de 3000 mL para medir la TCO y la TEA.

Además de las 20 cámaras utilizadas se dejó una sin organismos como control para poder determinar el consumo de oxígeno por los microorganismos presentes en el agua, y todas las mediciones se corrigieron con estos datos. Se llevaron a cabo dos repeticiones para cada prueba. Los resultados de la TCO se presentaron en mg de O₂.kg⁻¹.h⁻¹ en peso seco.

La concentración de amonio se determinó usando el método de azul de indofenol descrito por Rodier, (1998); las muestras de agua se colocaron en tubos de ensaye previamente tratados y lavados con ácido clorhídrico al 5% y enjuagados con agua destilada. Para producir la reacción de azul de indofenol, se utilizó 10 mL de agua de muestra con 0.4 mL de fenol, 0.4 mL de nitroprusiato de sodio y 1 mL de solución oxidante. Los tubos de ensayo fueron debidamente cubiertos con PARAFILM® y se dejaron incubar por una hora. Una vez que la reacción produjo el color final (después de una hora), las muestras fueron medidas en un espectrofotómetro de absorbancia (DR/4000U Spectrophotometer) a 640 nm. La concentración de amonio se determinó usando una curva estándar, con cloruro de amonio como indicador.

La TCO y la TEA de *S. annulatus* se calculó mediante las siguientes ecuaciones (Wright et al, 1995; Cerezo Valverde et al, 2006; Zhang et al, 2010):

$$TCO = (C_t - C_0) V / (W \times T)$$

$$TEA = (C'_t - C'_0) V / (W \times T)$$

dónde C_t y C'_t son los cambios en las concentraciones de oxígeno y amonio en las cámaras del respirómetro antes de las pruebas, y C_0 , C'_0 son los cambios en las concentraciones de oxígeno y amonio en la cámara control (blanco) antes de

las pruebas, V es el volumen de las cámaras, W y T son el peso húmedo de los organismos en Kg y el tiempo de duración en horas respectivamente.

La relación atómica oxígeno:nitrógeno (O:N) fue calculada utilizando los valores obtenidos del consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada de los botetes expuestos a las diferentes salinidades. Se calculó mediante la siguiente ecuación descrita por Flores et al, (2008):

$$O:N = \text{peso atómico } (NH_4^+) / \text{peso atómico } (O_2) * [QO_2] / [NH_4^+]$$

dónde $[QO_2]$, es el consumo de oxígeno, y $[NH_4^+]$ es el amonio total excretado por los organismos. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente por medio de una prueba de análisis de varianza de una vía para determinar si existieron diferencias significativas ($P > 0.05$) utilizando el software SigmaPlot v. 12.0.

Para determinar la presión osmótica de los peces de cada salinidad experimental; se tomaron 10 organismos, se anestesiaron con 2-Phenoxy-ethanol (0.8 mL/litro), se decapitaron, se tomó la sangre con una jeringa de 3 mL (estéril) directamente de la aorta dorsal y se tomó una alícuota de 10 μ L, el resto se mezcló con 300 μ L de una solución 1:1 de heparina (anticoagulante) para posteriores análisis. Simultáneamente se extrajeron las branquias y se congelaron a -70°C para otros estudios. La osmolaridad de la hemolinfa y del agua fue determinada con un

osmómetro de vapor Wescor 5520 (Logan, Utah, USA) y los datos se expresan en mOsm.kg⁻¹. Se calculó la capacidad osmorreguladora (CO) como la diferencia entre la osmolaridad de la sangre y la del medio externo, los datos fueron expresados en mOsm.kg⁻¹ (Díaz et al, 2001).

Para medir el nivel de expresión de la ATPasa de Na⁺/K⁺ fue necesario extraer ARN total a partir de muestras de tejido branquial de juveniles de *S. annulatus* mantenidos en las salinidades de prueba para posteriormente realizar transcripción reversa y obtener el ADN complementario (ADNc). Para esto se utilizaron 10 peces de cada salinidad experimental, de los cuales se tomaron ~100 mg de tejido branquial y el ARN total se extrajo utilizando TRIzol[®] (Invitrogen[™], CA, USA) siguiendo las instrucciones y recomendaciones del fabricante. Los pellets de ARN se disolvieron en agua DEPC y fueron tratados con DNase I Amp Grade (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante, con la finalidad de eliminar la contaminación de ADN genómico. Las concentraciones de ARN se determinaron utilizando un NanoDrop ND-1000 (LabTech, Wilmington, DE, USA), posteriormente se verificó su integridad física por electroforesis de agarosa al 1%. A continuación se sintetizó el ADNc por medio de transcripciones reversas utilizando 350 ng de ARN total, para ello se utilizó 1 µL de M-ML V RT (200 U/µL, Invitrogen) y 1 µL de iniciador (oligo dT₁₂₋₁₈) a una concentración de 500 µL/mL (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Posteriormente se realizó PCR (reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés) de las muestras de ADNc tratado con DNase I, para ello se utilizaron iniciadores degenerados diseñados a partir de regiones conservadas de la ATPasa de Na⁺/K⁺ de otras especies: *Dicentrarchus labrax* (AY532637), *Tilapia mossambica* (F109409), y *Danio reiro* (AF308599), datos publicados en el GenBank (NCBI). Las reacciones de PCR se realizaron utilizando un termociclador de gradiente (Eppendorf, Hamburg, Germany) usando 1 U/μL de Taq[®] ADN polimerasa (PROMEGA), 500 ng/μL de ADNc, MgCl₂ 25 mM, dNTPs 10 mM (Promega, Southampon, UK), amortiguador para PCR 5X (Invitrogen) y 10 mM de cada iniciador degenerado; SaNKA F 5'-CCAGGCRGCTACTGAGGACG-3' y SaNKA R 5'-CACAGTTGGTGGAGAAG-3' sintetizados por la empresa SEQXCEL (San Diego, USA). El protocolo de incubación incluyó un paso de desnaturalización inicial a 94°C por 3 min, posteriormente 30 ciclos de 94°C por 30s, 52°C por 40 s y 72°C por 2 min, y finalmente un paso final a 10°C para almacenamiento. Después, los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. Más tarde, los productos de PCR se purificaron utilizando un kit de purificación (PureLink PCR Purification Kit, Invitrogen) y clonados mediante un kit de clonación (TOPO[®] TA Cloning Kit, Invitrogen). Posteriormente el plásmido se insertó en células de *Escherinchia coli* quimio-competentes siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células transformadas se cultivaron en medio selectivo LB con kanamicina (0.05 mg/mL). Se realizó un PCR de colonias a partir de 10 clonas de cada cultivo para verificar el tamaño del

inserto (399 pb). Los productos de PCR de colonias fueron purificados y secuenciados bidireccionalmente utilizando iniciadores complementarios a la secuencia del vector; M13-F y M13-R (Invitrogen). Se prepararon reacciones para secuenciación y se enviaron a SEQXCEL. Las secuencias resultantes se cortaron y se agruparon mediante análisis de homología. El análisis de similitud de nucleótidos para la ATPasa de Na^+/K^+ se realizó utilizando el NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.gov/blast>). Subsecuentemente, los vectores con el inserto apropiado y secuencia confirmada se extrajeron mediante la técnica de Miniprep (Sambrook y Russell, 2001), se purificaron y se cuantificaron mediante una curva estándar (con 1010, 109, 108, 107, 106 y 105 diluciones) utilizando PCR en tiempo real.

La expresión genética se midió usando PCR en tiempo real cuantitativo (q-PCR) mediante un termociclador StepOnePlus Thermocycler (ABI, Foster City, CA, USA). Para esto, se usaron iniciadores específicos de la ATPasa de Na^+/K^+ de *S. annulatus* (HQ665505), dichos iniciadores fueron sintetizados por SEQXCEL. Las reacciones de PCR contenían 1 μL de cada iniciador (SaNKAF E 5'-CAGGCGGCTACTGAGGACG-3' y SaNKA Sp2 5'-CCATGTTCTTGAAGGA CTCCA-3') y 7.5 μL 2X Fast SYBR® Green Master Mix (ABI) en un volumen total de 15 μL . Para las reacciones de q-PCR se siguió el siguiente perfil de temperaturas: un ciclo a 95°C por 20 s seguidos de 40 ciclos a 95°C por 3 s y 60°C por 30 s. El número de copias de ARNm de cada muestra se calculó mediante los datos generados por el software OneStepPlus v2.1 (ABI) de

acuerdo a la interpolación con la curva estándar. Este método se basa en el ciclo umbral C_t (threshold cycle), el cual se refiere al número de ciclos fraccionales en el que se forma una cantidad fija de ADN (Ramakers et al, 2003). Los datos se transformaron mediante logaritmo base 10 (Log_{10}) y se graficaron para comparar las diferencias en los niveles de expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ .

Para analizar los datos estadísticamente, primero se realizaron pruebas de normalidad y homoscedasticidad para posteriormente utilizar análisis de varianza de una vía (ANOVA) y poder determinar el efecto de la salinidad sobre el consumo de oxígeno, expresión de amonio, presión osmótica de la sangre, la relación atómica O:N y sobre el nivel de expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ para ellos se utilizó el software SigmaStat v3.1 (Rockaway, NJ, USA). Se realizó un análisis de regresión lineal para describir el efecto de la salinidad sobre la osmolaridad de la sangre. Los puntos isosmóticos para los juveniles de botete diana se obtuvieron mediante la intersección con la línea de isosmolaridad.

RESULTADOS

En la Tabla I se muestran los datos para la TCO, TEA, y la relación atómica de O:N para la TCO en el botete diana, en todos los casos no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$), por lo que la salinidad no ejerció un efecto sobre estas variables fisiológicas. Para la TCO los valores se encontraron entre 27.9 a $30.9 \pm 4.3 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$. Resultados similares se encontraron para la TEA cuyos valores se presentaron de 0.600 a $0.691 \pm 0.144 \text{ mg NH}_4^+ \text{ h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$. Los valores para la relación atómica de O:N oscilaron de 53.12 a 59.26 ± 14.3 .

Tabla I. Tasa de consumo de oxígeno (TCO), tasa de excreción de amonio (TEA) y la relación atómica oxígeno-nitrógeno (O:N) de juveniles de *S. annulatus* aclimatados a diferentes salinidades. Los valores son las medias $\pm$ intervalos de confianza.

Salinidad (UPS)	TCO ($\text{mg O}_2 \text{ h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$)	TEA ($\text{mg NH}_4^+ \text{ h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$)	O:N
10	27.9 ± 3.7	0.62 ± 0.15	53.1 ± 12.8
17	29.5 ± 4.4	0.62 ± 0.17	56.4 ± 17.7
23	29.2 ± 6.0	0.60 ± 0.13	56.1 ± 14.0
29	30.0 ± 4.1	0.58 ± 0.10	59.3 ± 11.8
35	29.8 ± 2.1	0.62 ± 0.15	58.1 ± 13.6
41	30.9 ± 5.9	0.69 ± 0.18	53.5 ± 16.6

En la Figura 7 se muestra la relación entre las presiones osmóticas de la sangre del botete diana y la del agua de mar. Esta relación muestra una tendencia lineal y se confirmó mediante un análisis de regresión, se obtuvo el siguiente resultado:

$$MI = 312.78 + (0.042 \times ME), r^2 = 0.85$$

dónde MI es la presión osmótica de la sangre de los peces, y ME es la presión osmótica del agua de cultivo. El punto isosmótico para *S. annulatus* se estimó en 356 mOsm.kg⁻¹, y correspondió a la salinidad de 10.5 ups. El valor de la pendiente de la recta fue de 0.042. En la Figura 8 se muestra la CO. Se observa que en la salinidad de 10 ups se obtuvo un comportamiento de hiperosmorregulación y a partir de la salinidad de 17 a 41 ups los peces hipo-osmorregularon. De acuerdo al análisis de varianza, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las presiones osmóticas de los organismos expuestos a diferentes salinidades.

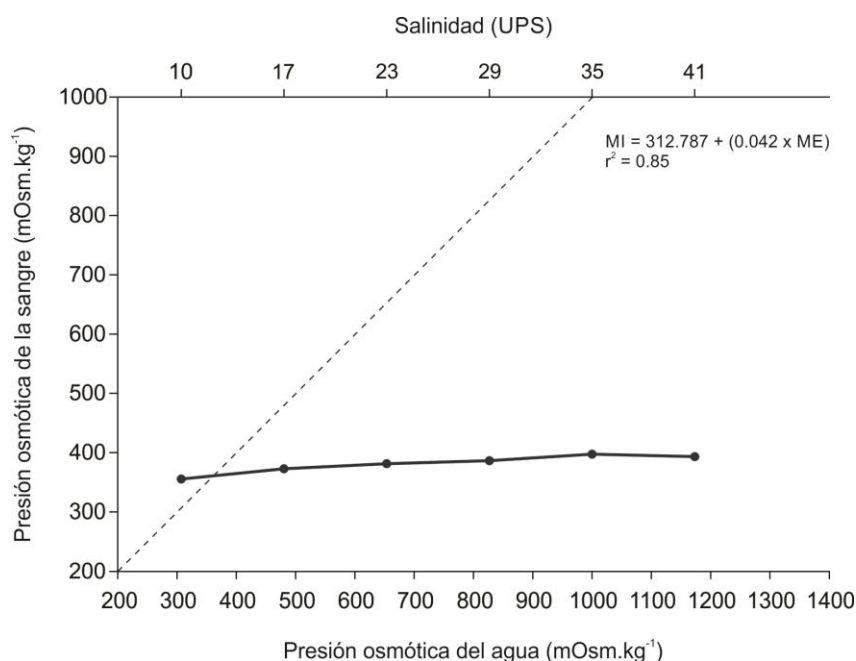


Figura 7. Relación entre la presión osmótica de la sangre con respecto al medio externo en juveniles de *S. annulatus* expuesto a diferentes. Los puntos indican los valores medios. La línea punteada de 45° representa la isosmolaridad.

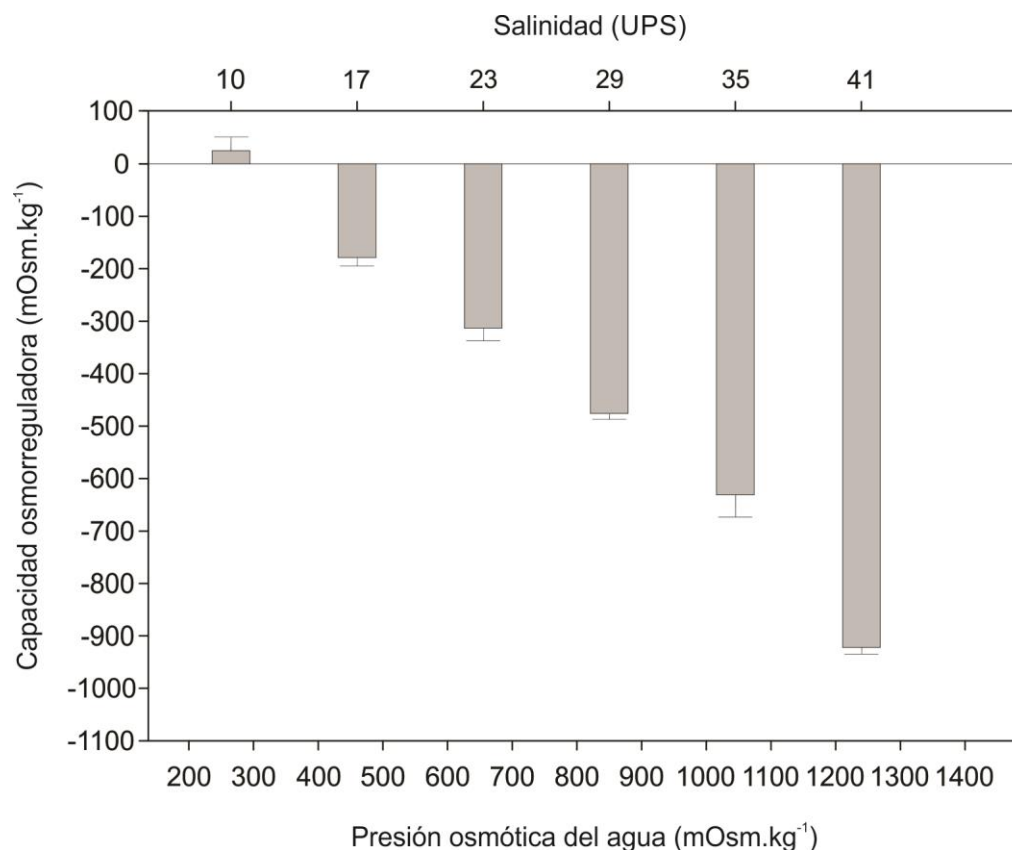


Figura 8. Capacidad osmorreguladora de juveniles de *S. annulatus*. Los valores positivos indica un patrón de hiperosmorregulación, y los valores negativos indican un patrón de hiposmorregulación.

Con los iniciadores degenerados SaNKDF y SaNKDR se amplificó el ADNc del tejido branquial de *S. annulatus* y se encontró un producto con un tamaño de 398 pb (ver secuencia anexa, en la Tabla II). Utilizando los iniciadores específicos usados para realizar la q-PCR (SaNKF y SaNKSp2) se amplificó un fragmento de 143 pb (Tabla II). Una vez que los productos fueron secuenciados y analizados mediante BLAST, se encontró que ambos fragmentos correspondieron a la subunidad α de la ATPasa de Na^+/K^+ , y se alcanzó una alta homología con otras especies; *Pargus pargus* (EU884412, Max Ident; 91%) y *Dicentrarchus labrax*

(AY532637, Max Ident; 91%), *Trematomus bernacchii* (DQ011268, Max Ident; 89%) y *Tilapia mossambica* (AF109409, Max Ident; 88%).

Tabla II. Secuencia de nucleótidos encontrada para la ATPasa de Na⁺/K⁺ de *S. annulatus* (398 pb) y su traducción a secuencia de aminoácidos.

Origen (3' – 5')	
1	<u>ccaggcggctactgaggacgatccggcaggcgataatttgtagccttggtattgtcctcac</u>
61	<u>agctgttggtcatcatcactggatgcttctcatactttcaagaggccaagagttccaaaat</u>
121	<u>catggagtccttcaagaacatgg</u> tgccgcagcaagctttggtgatccgtgagggggagaa
181	ggtgcagattaatgctgaagaagtgggtggctggagatctgattgaagtcaaggcgaggaga
241	caggattcctgctgacatcagggtgggttctgctcacggctgcaagggttgacaactcctc
301	actgacaggcgagtcagaacctcagagcagggtcacctgactgtacccatgacaacctct
361	ggagaccagaaacgtcgctttcttctccaccaactgtg
Traducción	
	QAATEDDPAGDNLYLGIVLTAVVIITGCFSYFQEAKSSKIMESFKNMVPQQALVIREGEKVQI NAEEVVAGDLIEVKGGDRIPADIRVVS AHGCKVDNSSLTGESEPQSRSPDCTHDNPLETRNV AFFSTNC

Las áreas sombreadas corresponden a las secuencias de los iniciadores específicos para la ATPasa de Na⁺/K⁺ de *S. annulatus* SaNKF y SaNKSp2 respectivamente. La parte subrayada corresponde a la secuencia amplificada mediante q-PCR (143 pb).

El análisis de q-PCR indicaron que los peces aclimatados a 41 ups presentaron el nivel más alto de expresión de la ATPasa de Na⁺/K⁺, y el nivel más bajo de expresión lo presentaron los organismos mantenidos en la salinidad de 10 ups (Figura 9). El análisis de varianza reveló diferencias significativas en los niveles de expresión de la ATPasa de Na⁺/K⁺ en *S. annulatus* expuesto a diferentes salinidades ($P < 0.05$).

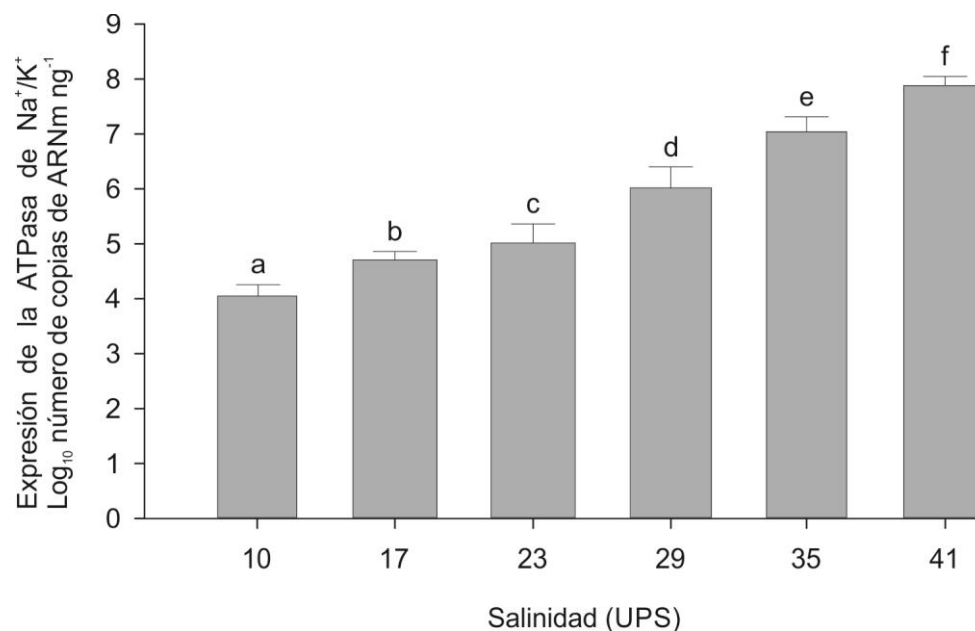


Figura 9. Nivel de expresión de la ATPasa de Na⁺/K⁺ branquial de *S. annulatus* basado en el número de copias de ARNm en las diferentes salinidades experimentales. Se representan los valores medios $\pm$ los intervalos de confianza. Las diferentes letras indican las diferencias significativas encontradas ($P < 0.05$).

Tabla III. Nivel de expresión (media $\pm$ intervalos de confianza) de la ATPasa de Na⁺/K⁺ branquial de juveniles de *S. annulatus*, aclimatados a diferentes salinidades.

Salinidad (UPS)	Expresión de la ATPasa de Na ⁺ /K ⁺ Log ₁₀ número de copias de ARNm.ng ⁻¹
10	4.0 $\pm$ 0.20 ^a
17	4.7 $\pm$ 0.13 ^b
23	5.0 $\pm$ 0.32 ^c
29	5.9 $\pm$ 0.19 ^d
35	6.8 $\pm$ 0.16 ^e
41	7.8 $\pm$ 0.10 ^f

Las diferentes letras indican las diferencias significativas encontradas entre las salinidades ($P < 0.05$).

DISCUSION

Investigaciones previas han encontrado que los factores externos como la salinidad y la temperatura afectan al consumo de oxígeno y excreción de amonio en los teleósteos marinos (Gracia-López et al, 2006; Marshall y Grosell, 2006; Zheng et al, 2008), sin embargo, en este estudio se encontró que la salinidad no afectó de manera directa a la TCO y a la TEA. Kinne, (1967) describió cuatro tipos de respuestas: (1) la tasa de consumo de oxígeno no es influenciada por la salinidad, (2) la tasa metabólica de los organismos se incrementa en salinidades reducidas y disminuye en salinidades altas, (3) la tasa metabólica se incrementa tanto en salinidades altas como en bajas, y (4) la tasa de consumo de oxígeno disminuye en bajas como en altas salinidades. De acuerdo a esto, *S. annulatus* exhibió la respuesta tipo 1, en donde la TCO no se vio influenciada por los cambios de salinidad. Resultados similares se han encontrado en otras especies; *Ambassis interrupta*, *Leiostomus xanthurus*, *Cyprinodon variegates*, *Chanos chanos*, *Amphanius dispar*, *Centropomus parallelus*, *Lutjanus griseus* y *Miichthys miiuy* (Nordlie, 1978; Moser y Miller, 1994; Haney y Nordlie, 1997b; Swanson, 1998; Plaut, 2000; da Silva Rocha et al, 2005; Zheng et al, 2008; Wuenschel et al, 2005). En estas especies, las alteraciones en la tasa metabólica debidas a la salinidad fueron pequeñas, especialmente después de un periodo adecuado de aclimatación a las salinidades de prueba (Claireaux y Lagardère, 1999). Las especies que presentan este tipo de respuestas se consideran eurihalinas y

pueden habitar en ambientes con salinidades variables, como en los que habita *S. annulatus*.

En el estudio realizado por Shi et al, (2011) en el pez globo asiático *Takifugu rubripes* se encontró que la TCO se incrementó significativamente con el incremento de la salinidad de 5 a 25 ups, y disminuyó significativamente al incrementar la salinidad de 25 a 35 ups, y de acuerdo con Kinne, (1967) esta especie presentó una respuesta tipo 4. Estos resultados contrastan con los obtenidos en este estudio; probablemente esta diferencia se debió a que el rango de salinidad optimo para esta especie es de 23 a 25 ups, y esta muy cerca de los límites superiores reportados en esta especie (Zhang et al, 2010).

En este trabajo se encontró que la salinidad no ejerció un efecto significativo sobre la TEA en el botete diana. Este resultado es similar al encontrado previamente en otras especies; *C. undecimalis* y *Miichthys miiu* (Gracia-López et al, 2006; Zheng et al, 2008), estos estudios no encontraron diferencias significativas en la excreción de amonio cuando los peces fueron expuestos a un rango de salinidades de 12 a 35 ups. En base a esto, se puede considerar que *S. annulatus* posee una alta capacidad para adaptarse a diferentes salinidades con un mínimo costo metabólico en osmorregulación. Sin embargo, esto puede contrastar con resultados encontrados para otras especies como *Oligocottus maculatus*, y *C. parallelus*, en ambas especies, la salinidad ejerció un efecto significativo sobre la excreción de amonio, ya que la TEA se incrementó en bajas salinidades y disminuyó en altas (Wright et al, 1995; da Silva Rocha et al, 2005).

La relación atómica O:N es un indicador que aporta información sobre que tipo de sustrato es usado por los organismos bajo sus condiciones ambientales. Los valores de O:N de 3 a 16 indican un catabolismo de proteínas, valores de 50 a 60 indican un catabolismo mixto de proteínas y lípidos, valores mayores a 60 representan la utilización de carbohidratos como fuente preincipal de energía. Valores bajos de la relación O:N pueden ser un indicador de estrés (Mayzaud y Conover, 1988; da Silva Rocha et al, 2005; Gracia-López et al, 2006; Zheng et al, 2008). En este estudio los valores de la relación O:N para *S. annulatus* fueron mayores a 50 pero menores a 60. En otras palabras, se puede inferir que bajos las condiciones experimentales de salinidad, esta especie usó una mezcla de proteínas y lípidos como principal recurso energético, indicando que el botete diana no presentó estrés por efecto de las salinidades experimentales. Lo que sugiere que *S. annulatus* puede efectuar sus funciones metabólicas a pesar de los cambios de salinidad. Este resultado es consistente con los encontrados para otras especies eurihalinas; en *Miichtys miiuy*, la salinidad no ejerció un efecto significativo sobre los valores de la relación O:N (Zheng et al, 2008). En contraste, en *C. undecimalis* cuyo hábitat suele ser el mismo que *S. annulatus*, al ser expuesto a bajas salinidades los valores de O:N disminuyeron indicando la presencia de estrés (Gracia-López et al, 2006). En otras especies eurihalinas como *Sparus sarba*, Woo y Kelly, (1995) encontraron que, metabólicamente las bajas salinidades favorecieron el catabolismo de proteínas, pero cuando *S. sarba* se encontró en su punto isosmótico, los peces utilizaron una mezcla de lípidos y carbohidratos como sustrato metabólico. Esto indicó que los peces eurihalinos

pueden cambiar de sustratos metabólicos de acuerdo a las salinidades experimentales.

La osmolaridad de la sangre en *S. annulatus* se relacionó linealmente con la osmolaridad de la salinidad experimental, al igual que otras especies de teleosteos eurihalinos (Sampaio y Bianchini, 2002; Laiz-Carrión et al, 2005; Herrera et al, 2009). El botete diana puede ser considerado como un organismo con gran capacidad de osmorregulación debido a que la pendiente de su comportamiento osmorregulador presentó un valor cercano a cero (0.042). Este resultado es muy similar al encontrado para otras especies eurihalianas como *Paralichthys orbignyanus* y *Solea senegalensis* (Sampaio y Bianchini, 2002; Arjona et al, 2009). Cuando la pendiente del comportamiento osmorregulador es cero indica un comportamiento absolutamente **osmorregulador**, sin embargo, cuando la pendiente es 1 indica un comportamiento de osmoconformación (Marshall y Grosell, 2006). *S. annulatus* mostró una gran capacidad para adaptarse a diferentes salinidades al igual que *Poecilia latipinna*, *Chanos chanos* y *Centropomus undecimalis*, debido a que la osmolaridad de la sangre estuvo en función de la salinidad (Nordlie, 1978; Swanson, 1998; Gracia-López et al, 2006). El botete diana fue hiperosmótico a bajas salinidades (10 ups) e hiposmótico a altas salinidades; este resultado es similar al obtenido en *Sphoeroides testudineus* y juveniles de *S. greeleyi*, ambas especies fueron hiperosmóticas a 4 ups e hiposmóticas en salinidades de 14 a 29 ups (Prodocimo y Freire, 2004).

El punto isosmótico encontrado para *S. annulatus* fue de 356 mOsm.kg⁻¹ (10.5 ups), y fue similar al encontrado en otras especies de peces globo como *S. testudineus* y *S. greeleyi*, cuyos puntos isosmóticos fueron de 320 y 360 mOsm.kg⁻¹ respectivamente (Prodocimo y Freire, 2004). En otras especies eurihalinas como *Gillichthys mirabilis*, *Paralichthys orbignyanus* y *Dicologlossa cuneata* se encontraron puntos isosmóticos similares (Yoshikawa et al, 1993; Sampaio y Bianchini, 2002; Herrera et al, 2009). Tomando en cuenta los procesos de osmorregulación, el movimiento pasivo de iones y de agua entre el medio interno y el externo es muy baja, en este caso, la osmorregulación en 10.5 ups es mínima. En apoyo a esta hipótesis; el nivel bajo de expresión de la ATPasa de Na⁺/K⁺ se encontró en los peces aclimatados a la salinidad más baja (10 ups) muy cerca de su punto isosmótico (Tabla III).

Los teleósteos eurihalinos exhiben cambios adaptativos en los niveles de transcripción de la ATPasa de Na⁺/K⁺ branquial en respuesta a los cambios de salinidad (Kang et al, 2008; Evans, 2010). En este estudio, se analizó por primera vez el nivel de expresión de la ATPasa de Na⁺/K⁺ en *S. annulatus* mediante q-PCR para cuantificación, este método ha sido empleado para otras especies (Scott et al, 2004; Tse et al, 2006; Kang et al, 2010). Aunque en muchos estudios similares a este, pero en otras especies de peces eurihalinos se ha utilizado el método de actividad enzimática; NADH-linked NKA activity assay (McCormick, 1993; Uchida et al, 2000; Imsland et al, 2003; Tipsmark et al, 2002; Bystriansky et al, 2007; Kang et al, 2008). Por otro lado, la técnica de q-PCR permite hacer

análisis a partir de cantidades pequeñas de ácidos nucleicos, es una herramienta fundamental para la investigación básica en la biología molecular y la biotecnología ya que permite obtener resultados muy precisos (Heid et al, 1996; Bustin, 2002). En este estudio, se encontró que la salinidad afectó significativamente el nivel de expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ ; en altas salinidades *S. annulatus* exhibió un nivel alto de expresión, en contraste, a bajas salinidades (10 ups) el botete diana presentó el nivel más bajo de expresión. Un resultado similar fue encontrado por Lin et al, (2004b) en *Tetraodon nigroviridis*. La expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ branquial está relacionada con la capacidad de osmorregulación de las branquias y su habilidad para secretar el exceso de iones en un ambiente hiperosmótico (McCormick, 2001; Marshall, 2002), e incorporar iones en un medio hiposmótico (Jensen et al, 1998; Lin et al, 2004b). Probablemente *S. annulatus* usa estos mecanismos conservados para aclimatarse a ambientes de diferentes salinidades. En relación con la salinidad externa; en trabajos previos se han reportado patrones de expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ branquial en una curva en forma de “U”. Los resultados en este estudio siguieron este modelo, y es similar a lo encontrado en otros teleósteos eurihalinos (Jensen et al, 1998; Sampaio y Bianchini, 2002; Deane y Woo, 2004; Laiz-Carrión et al, 2005; Sangiao-Alvarellos et al, 2006; Kang et al, 2010; Lundgreen et al, 2008; Herrera et al, 2009).

El nivel más bajo de expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ branquial en *S. annulatus* se presentó en su punto isosmótico; cuando la diferencia entre la osmolaridad de

la sangre con la del agua fue mínima y se gasta menos energía en procesos para la osmorregulación, este resultado es similar al reportado por Lundgreen et al, (2008) en *Platichthys flesus* y por Herrera et al, (2009) en *D. cuneata*.

En resumen, en base a los resultados encontrados en este estudio con juveniles *S. annulatus*, esta especie marina/estuarina puede ser considerada como eurihalina, capaz de realizar hiposmorregulación e hiperosmorregulación. Este trabajo es una contribución para entender de una mejor manera los procesos de osmorregulación en esta especie y para definir las sus salinidades optimas de cultivo.

Principales hallazgos

- La salinidad no afectó significativamente al consumo de oxígeno y excreción de amonio ($P > 0.05$).
- El comportamiento osmorregulador fue lineal con una pendiente cercana a cero, los peces mantuvieron su PI constante y se encontró el punto isosmótico de 356 mOsm.kg^{-1} y correspondió a la salinidad de 10.5 ups.
- Los peces hiper-osmorregularon en la salinidad de 10 ups e hipo-osmorregularon en las salinidades de 17 a 41 ups.
- De acuerdo a la relación O:N se encontró que los peces no presentaron estrés por efecto de la salinidad.
- Se obtuvo una secuencia parcial de 143 pb de la ATPasa de Na^+/K^+ para *S. annulatus*.
- El análisis de q-PCR indicó que la salinidad afectó significativamente ($P < 0.05$) a la expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ . El mayor nivel de expresión se encontró en la salinidad de 41 ups y el menor en la salinidad de 10 ups.
- Se encontró que los juveniles de botete diana pueden ser mantenidos en bajas y en altas salinidades sin estresarse demostrando una gran capacidad de osmorregulación.

CAPITULO II

Efecto de salinidades fluctuantes sobre respuestas fisiológicas y metabólicas en el botete diana *Sphoeroides annulatus*.

INTRODUCCIÓN

El botete diana *Sphoeroides annulatus* es una especie de pez globo ampliamente distribuida en el Pacífico Mexicano con gran potencial para la acuicultura. Debido a que esta especie habita en estuarios en donde suelen ocurrir cambios graduales o repentinos de salinidad, es necesario evaluar la capacidad de esta especie para soportar dichas fluctuaciones ambientales, además de estudiar qué mecanismos fisiológicos de osmorregulación utiliza para estos fines, ya que tanto la salinidad como la temperatura afectan de manera directa a la tasa metabólica de los organismos acuáticos e impactan su crecimiento y sobrevivencia (Arias-Rodríguez et al, 2004b; Zhang et al, 2010; Ostrowski et al, 2011). También, es importante revisar el efecto de la salinidad sobre los patrones y mecanismos de osmorregulación, excreción nitrogenada y consumo de oxígeno en el botete diana, de esta manera se podrán establecer mejores condiciones para su cultivo con base a su capacidad de aclimatación ante cambios graduales de salinidad. La mayoría de la investigación realizada en esta especie ha estado enfocada a aspectos reproductivos, parasitológicos, nutrición y crecimiento en cautiverio (Martínez-Chavez et al, 2003; Fajer-Ávila et al, 2004; Fajer-Ávila et al, 2008; García-Ortega, 2009; Abdo-de la Parra et al, 2010). Recientemente se evaluó el efecto de diferentes temperaturas y el efecto de diferentes salinidades sobre el consumo de oxígeno, excreción nitrogenada, osmorregulación y el nivel de expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ en esta especie (Reyes et al, 2011; Pérez-

Robles et al, 2012) Sin embargo, se desconoce la respuesta de *S. annulatus* a cambios fluctuantes de salinidad.

Pérez-Robles et al, (2012) analizaron el efecto de seis salinidades constantes (10, 17, 23, 29, 35 y 41 ups) a temperatura constante (26 °C) sobre el consumo de oxígeno, la excreción de amonio y la osmorregulación, se encontró que estas salinidades no fueron estresantes y no se detectaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en la TCO y la TEA, además la relación atómica O:N presentó valores entre 50 y 60 indicando que *S. annulatus* utilizó una mezcla de proteínas y lípidos para obtener energía. También se ubicó el punto isosmótico (PI) en 356 mOsm.kg⁻¹ (10 ups), el cual coincide con los PI encontrados en otras especies eurihalinas de la Familia Tetraodontidae como *S. testudineus*, *Takyfugu obscurus* y, *T. rubripes* (Prodocimo y Freire, 2004; Kato et al, 2005). En base a estos estudios, se corroboró la eurihalinidad de *S. annulatus* y se consideró a esta especie como un osmorregulador fuerte, presentando osmorregulación hiperosmótica en bajas salinidades e hiposmótica en altas manteniendo su presión osmótica (PO) constante en el rango de 10 a 41 ups). Sin embargo, surge la pregunta; ¿el botete diana es capaz de soportar cambios graduales de salinidad y con qué intensidad?, es decir, ¿cuál sería el comportamiento fisiológico de *S. annulatus* al aumentar y disminuir la salinidad de su medio a una tasa constante? Esta cuestión resulta esencial, ya que bajo condiciones de cultivo en maricultura o en sistemas de recirculación acuícola las variaciones de salinidad son frecuentes y pueden afectar al crecimiento de los animales. Por

esta razón, se diseñó un experimento en donde juveniles de botete diana aclimatados a una salinidad de 35 ups se sometieron a cambios graduales de salinidad (41, 35, 19, 23 y 17 ups) a una temperatura constante de 26 °C. En cada salinidad se midió el consumo de oxígeno, excreción nitrogenada y los niveles de expresión de transcritos de la ATPasa de Na^+/K^+ en branquias, con el objeto de evaluar de qué forma y a qué nivel la salinidad fluctuante influye en estas respuestas fisiológicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo se realizó con juveniles de *S. annulatus* de un año de edad (peso medio $\pm$ DS; 135 ± 5.3 g), los organismos se trasladaron vía área desde el CREMES (Centro de Reproducción de Especies Marinas del Estado de Sonora) hasta el CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada) en donde se mantuvieron en un invernadero del departamento de Biotecnología Marina. Los organismos ($n = 190$) se colocaron en estanques de 2000 L de capacidad conectados a un sistema de recirculación acuícola, y fueron aclimatados a una salinidad de 35 ups por 25 días y a temperatura constante de 26 ± 1 °C utilizando calentadores de titanio de 1000 W regulados por controladores automáticos (HX 150, Neslab Instruments, Portsmouth NH, USA) de acuerdo a lo descrito por Reyes et al, (2011). Diariamente se midió la salinidad con un refractómetro (ATAGO® Tokyo, Japan), para tener un control de variaciones de salinidad y se realizaron recambios de agua del 70% del volumen de los estanques para eliminar desechos; alimento no asimilado y heces, además, reducir la concentración de nitratos y nitritos. Los organismos se alimentaron diariamente con alimento comercial de 50 % de proteína a saciedad, por la mañana, a medio día y dos veces por la tarde. Se consideró un fotoperiodo de 12 horas oscuridad y 12 horas luz.

Para medir el efecto de salinidades fluctuantes sobre el consumo de oxígeno, excreción nitrogenada, la osmorregulación y el nivel de expresión de la ATPasa

de Na^+/K^+ branquial, se utilizó un respirómetro de recirculación con capacidad para 20 organismos y un control como el utilizado por Díaz et al, (2007) y Pérez-Robles et al, (2012). El respirómetro se llenó con agua de mar a 35 ups y se mantuvo a una temperatura constante de 26 °C. Una vez transcurrido el tiempo de aclimatación (20 días) y antes de someter a los organismos a cambios bruscos de salinidad, los peces se mantuvieron en ayuno por 24 h, 20 de ellos se colocaron en cada una de las cámaras del respirómetro de acuerdo con Pérez-Robles et al, (2012), dejando una cámara vacía como control para determinar el consumo de oxígeno y excreción nitrogenada de los microorganismos presentes en el agua, al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones de salinidad, temperatura y alimentación se mantuvieron 90 peces en un estanque de 2000 L. Cada salinidad se obtuvo utilizando agua de mar filtrada y agua dulce libre de cloro, y para obtener la salinidad de 41 ups se utilizó agua de mar y sal de mar sin iodo.

Para exponer a los peces a salinidades fluctuantes a todos los organismos (tanto los del estanque de 2000 L, como los colocados en el respirómetro) se les aumentó la salinidad gradualmente hasta 41 ups, posteriormente se les disminuyó la salinidad a 35, 29, 23 y 17 ups, después se aumentó a 23, 29, 35 y 41 ups, los peces permanecieron tres horas en cada una de las salinidades y el tiempo de transición entre cada salinidad fue de una hora (Figura 10). En cada matraz del respirómetro se midió la concentración de oxígeno y el porcentaje de saturación inicial. Al momento de registrar las mediciones iniciales de oxígeno

disuelto con un oxímetro YSI 52 (Yellow Spring Instruments Yellow Springs, OH, USA), se tomaron 10 mL de agua para poder medir la concentración de amonio inicial posteriormente. Inmediatamente después tomar esta muestra, se cerró el flujo de agua hacia el interior de las cámaras durante 30 minutos ya que de acuerdo a Stern et al, (1984) es el tiempo indicado para que la reducción de oxígeno disuelto no sea menor del 30%. Pasado estos minutos, se realizó la medición final tanto de oxígeno como de amonio (otros 10 mL de agua de la cámara) y se reabrió el flujo del agua aireada para que los organismos se recuperasen. El mismo procedimiento se realizó para cada cambio de salinidad, y de manera simultánea se sacrificaron 10 individuos de los colocados en el estanque de 2000 L. Estos animales fueron anestesiados con 2-Phenoxy-ethanol (0.8 mL/litro) durante un minuto, se decapitaron rápidamente y se colectaron 300 μ L sangre de cada uno (10 individuos de cada salinidad) con una jeringa estéril, también se tomaron 10 μ L de sangre directamente de la aorta dorsal para medir la presión osmótica. Las muestras sanguíneas se almacenaron con una solución de heparina como anticoagulante (3:1) y se congelaron a -20 °C. También se extrajeron los dos arcos branquiales, se envolvieron en papel aluminio y se colocaron en bolsas individuales previamente etiquetadas para congelar a -70 °C y poder realizar una extracción de ARN. A partir de las muestras de sangre frescas (sin Heparina) y del agua de cada salinidad, se midió la Presión Osmótica (PO) que equivale a concentración de osmolitos. Para esto se utilizó un osmómetro de vapor 5520 (Logan, Utah, USA). Con los datos obtenidos se determinó la capacidad osmorreguladora (CO) de los peces sometidos a

salinidades fluctuantes. La CO se calculó mediante la diferencia entre la PO de la sangre contra la del medio externo de acuerdo con Lignot et al, (2000).

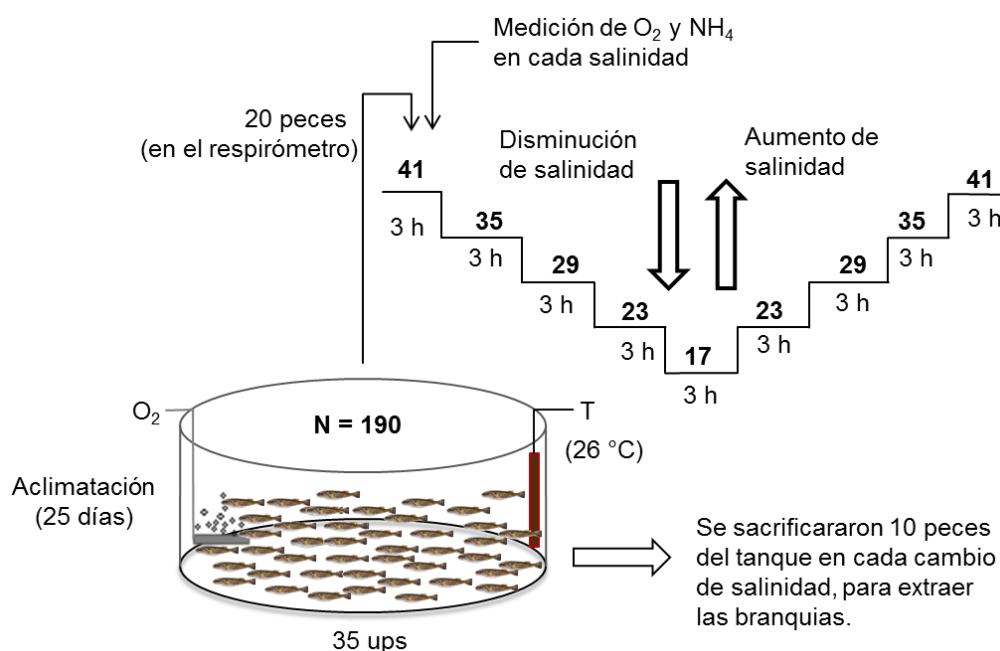


Figura 10. Representación esquemática del procedimiento que se siguió para medir las variables objetivo disminuyendo y aumentando la salinidad. Los organismos permanecieron 3 horas en cada salinidad. A los peces mantenidos en el tanque también se sometieron a los cambios fluctuantes de salinidad al mismo tiempo que los colocados en el respirómetro.

La cantidad de amonio presente en las muestras se midió usando el método de azul de indofenol descrito por Rodier, (1998); para ello se colocaron 10 mL en tubos de ensayo limpios (previamente lavados con ácido clorhídrico al 5% y enjuagados con agua destilada). La reacción de azul de indofenol se llevó a cabo mezclando 10 mL de muestra de agua con 0.4 mL de fenol, 0.4 mL de nitroprusiato de sodio y 1 mL de solución oxidante. Después de una hora se midió

la absorbancia de cada reacción a 640 nm con un espectrofotómetro (DR/4000 U Spectrophotometer) siguiendo las recomendaciones de Pérez-Robles et al, (2012).

La TCO y la TEA de *S. annulatus* se calculó mediante las siguientes ecuaciones (Wright et al, 1995; Cerezo Valverde et al, 2006; Zhang et al, 2010):

$$TCO = (C_t - C_o) V / (W \times T)$$

$$TEA = (C'_t - C'_o) V / (W \times T)$$

dónde C_t y C'_t son los cambios en las concentraciones de oxígeno y amonio en las cámaras del respirómetro antes de las pruebas, y C_o , C'_o son los cambios en las concentraciones de oxígeno y amonio en la cámara control (blanco) antes de las pruebas, V es el volumen de las cámaras, W y T son el peso húmedo de los organismos en Kg y el tiempo de duración en horas respectivamente.

El índice de la relación atómica oxígeno – nitrógeno (O:N) se calculó utilizando los valores del consumo de oxígeno y de excreción de amonio de los peces expuestos a salinidades fluctuantes, para ello se utilizó la siguiente ecuación (Mayzaud y Conover, 1988)

$$O:N = \text{peso atómico } (NH_4^+) / \text{peso atómico } (O_2) * [QO_2] / [NH_4^+]$$

dónde $[QO_2]$, es el consumo de oxígeno, y $[NH_4^+]$ es el amonio total excretado por los organismos. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente por medio de una prueba de análisis de varianza de una vía para determinar si existieron diferencias significativas ($P > 0.05$) utilizando el software SigmaPlot v. 12.0.

Para medir el nivel de expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ branquial se utilizó como muestra las branquias de 10 organismos sacrificados en cada salinidad ($n = 100$) siguiendo los procedimientos descritos por Ostrowski et al, (2011), Giffard-Mena et al, (2011) y Pérez-Robles et al, (2012) con algunas modificaciones. Para ello se pesaron 100 mg de todo el tejido branquial (filamentos y lamelas) y se realizaron extracciones de ARN total utilizando el método de TRIzol® (Invitrogen™, CA, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los pellets se disolvieron en 100 μ L de H_2O ppi y se trataron con DNase I Amp. Grade (Invitrogen™) para eliminar la contaminación con ADN genómico siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN de cada muestra se determinó con un NanoDrop ND-1000 (LabTech, Wilmington, DE, EUA) y su integridad física se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Posteriormente se retro transcribió (RT) el cDNA a usando 350 ng de cada muestra de ARN total, 1 μ L de M-MLV RT (200 U/ μ L, Invitrogen) y 1 μ L de cebadores Oligo(dT₁₂₋₁₈) (500 μ g/mL, Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para cuantificar el nivel de expresión de transcritos de la ATPasa Na^+/K^+ por PCR en tiempo real (q-PCR) se utilizaron las condiciones descritas por Pérez-Robles et al, (2012). Para ello se utilizó un termociclador StepOnePlus (ABI, Foster City, CA, EUA) y los iniciadores específicos SaNKAF E y SaNKA Sp2 para detectar esta enzima (Tabla II). La mezcla de reacción con volumen final de 15 μL consistió en; 7.5 μL de Fast SYBR[®] Green Master Mix (ABI) 2X, 1 μL de cDNA (ADN complementario) a 350 ng/ μL (concentración final de 23.33 ng/ μL), y 1 μL de cada cebador (5 mM). Las reacciones de Q-PCR se realizaron con el siguiente perfil de temperaturas: 1 ciclo a 95 °C por 20 s, seguido por 40 ciclos a 95 °C por 3 s y 60 °C por 30 s. Se realizó una cuantificación absoluta interpolando los valores de Ct a partir de una curva estándar, este punto Ct está basado en el ciclo umbral (del inglés threshold cycle) que representa el número de copias generados en determinados ciclos para obtener el número de copias de cada muestra (Ramakers et al, 2003). Se tomaron los datos calculados directamente por el programa OneStepPlus v2.2 (ABI).

Se aplicaron análisis de varianza de una vía a los datos ($\alpha = 0.05$) para revisar el efecto de la salinidad sobre la TCO, TEA, la relación O:N, la osmorregulación y el nivel de expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ . Cuando se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$), se realizaron pruebas para la comparación entre medias, además, se efectuó un análisis de regresión lineal para describir el efecto de la salinidad sobre la osmolaridad de la sangre de los peces. El punto isosmótico del botete diana se determinó como la intersección de esta línea con la línea de

isomolaridad. Para estos análisis se utilizó el software SigmaStat v. 3.1, los resultados se graficaron en SigmaPlot v.

RESULTADOS

Al someter los organismos a salinidades fluctuantes se constata que dichos cambios producen variaciones entre los valores de la TCO de 23.71 a $33.92 \pm 3.75 \text{ mg O}_2 \text{ h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Tabla IV). En la Figura 11 se observa que la salinidad ejerció un efecto significativo ($P < 0.05$) sobre la TCO, TEA, y la relación O:N. Resultados similares se encontraron para la TEA, cuyos valores fueron de 1.01 a $1.46 \pm 0.18 \text{ mg NH}_4^+ \text{ h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$, al mismo tiempo se afectó significativamente la relación atómica O:N cuyos valores fluctuaron de 22.20 a 30.44 ± 5.45 . A la salinidad más baja probada (17 ups) incrementaron valores de la TCO, la TEA. Del mismo modo, la relación O:N fue menor en las salinidades más bajas ($17\downarrow$, $23\downarrow$ y $23\uparrow \text{ ups}$).

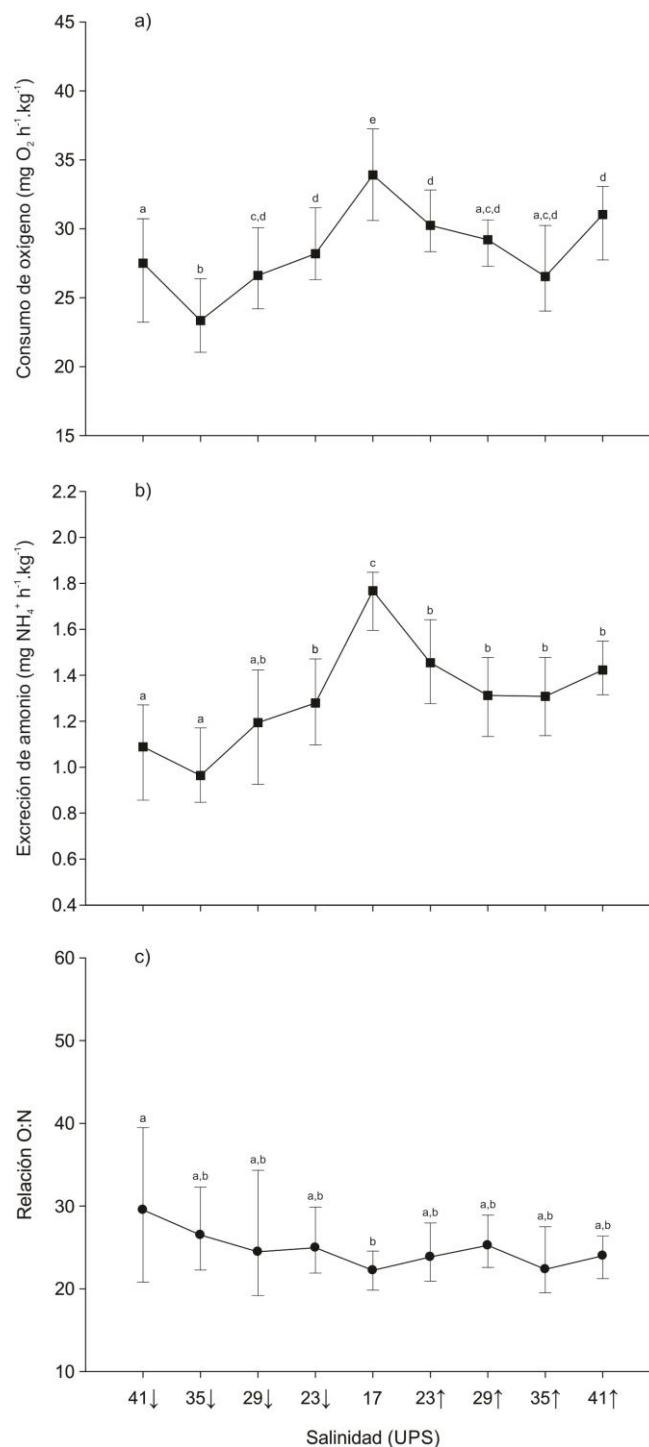


Figura 11. Efecto de las salinidades fluctuantes sobre: a) tasa de consumo de oxígeno (TCO), b) tasa de excreción de amonio (TEA) y c) relación atómica oxígeno-nitrógeno (O:N) en juveniles de *S. annulatus* (media $\pm$ DE). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las salinidades ($P < 0.05$) y la flechas ($\downarrow \uparrow$) indican la dirección de disminución y aumento de la salinidad. N=183.

La relación entre la osmolaridad de la sangre de los peces con la de su medio externo se presenta en la Figura 12, en el eje de las abscisas se representan los cambios de salinidad efectuados cuya dirección de aumento o disminución se indican con flechas ($\downarrow\uparrow$), de tal modo que la salinidad más baja de 17 ups está en el centro de la figura y del lado izquierdo se muestra esta relación al disminuir la salinidad de 41 $\downarrow$ a 17 ups, y del lado derecho de aumentar la salinidad de 17 hasta 41 $\uparrow$ ups. En ambos casos la osmolaridad interna de los peces permaneció estable, y esto se confirmó con un análisis de regresión en donde se obtuvieron las siguientes ecuaciones; a) disminución de salinidad y b) aumento de salinidad:

$$a) MI = -348.711 + (0.0053 \times ME), r^2 = 0.94$$

$$b) MI = 358.433 - (0.00585 \times ME), r^2 = 0.91$$

dónde MI es la osmolaridad del medio interno y ME equivale a la osmolaridad del medio externo, y se aprecia que no se ubicó el punto isosmótico (dónde $MI \approx ME$). Los valores de las pendientes de ambas ecuaciones son cercanos a 0, y de acuerdo al análisis de varianza, no existen diferencias significativas ($P > 0.05$) en la osmolaridad interna entre los organismos sometidos a cambios de salinidad.

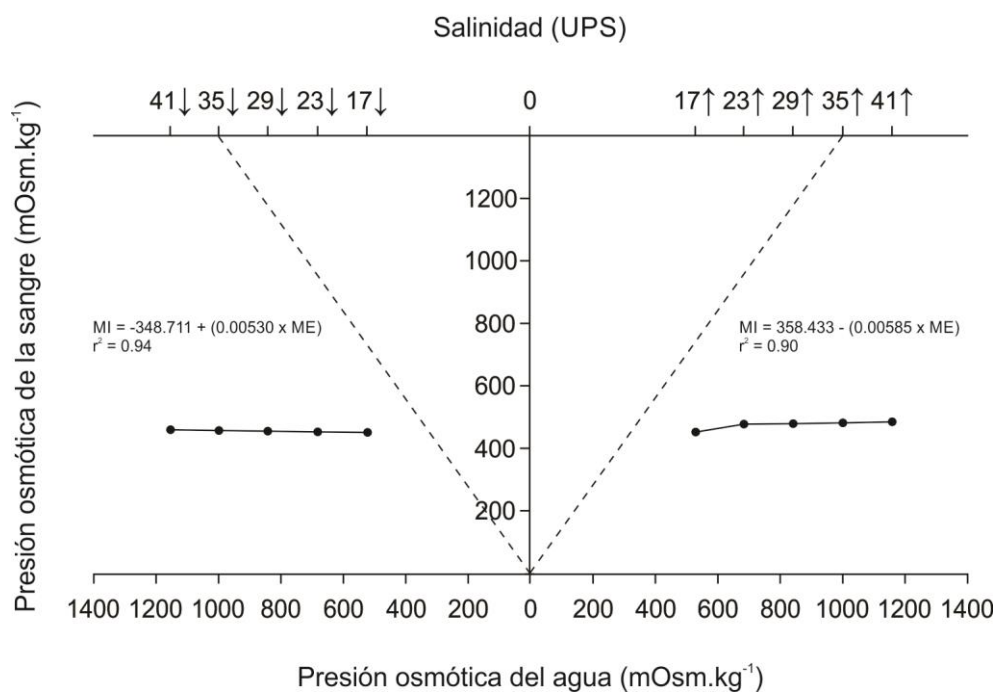


Figura 12. Relación entre la osmolaridad del medio interno de *S. annulatus* con la del medio externo al ser sometido a variaciones de salinidad. La línea de 45° indica la isosmolaridad. MI; medio interno, ME; medio externo. Las flechas (↓↑) indican la dirección de disminución y aumento de la salinidad. N=183.

La CO de los juveniles de botete diana sometidos a salinidades fluctuantes se presentan en la Figura 13 donde podemos constatar que la especie presenta un patrón de osmorregulación hiposmótico tanto al disminuir la salinidad del medio externo, como al aumentarla (en las salinidades de prueba desde 17 hasta 41 ups).

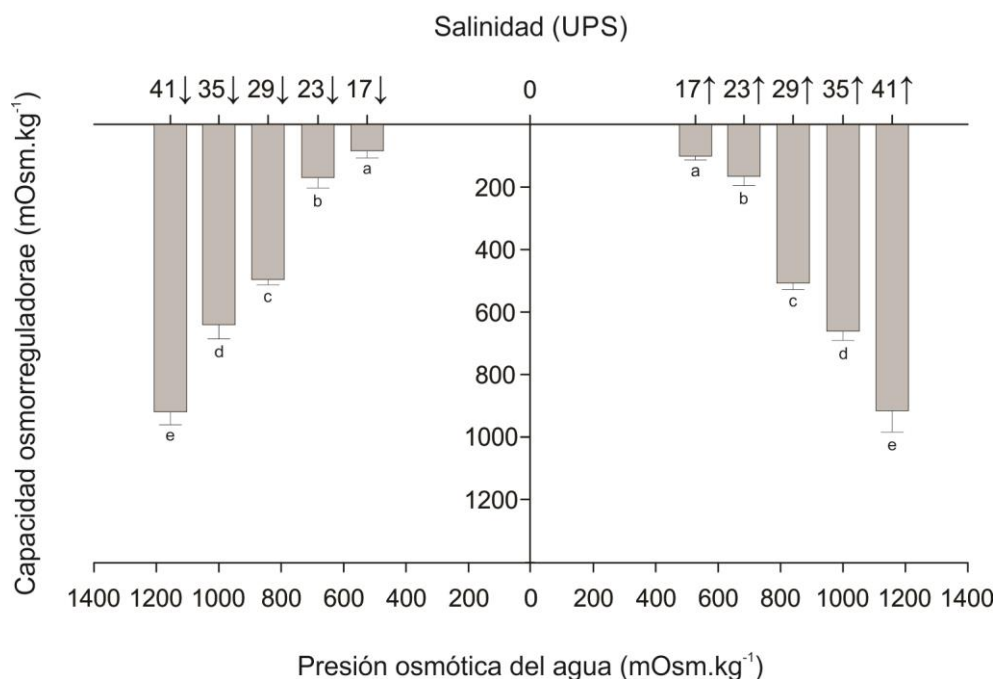


Figura 13. Capacidad osmorreguladora de juveniles de *S. annulatus* sometido a cambios de salinidad. Valores positivos indican un patrón de osmorregulación hiperosmótico, y valores negativos indican un patrón de osmorregulación hiposmótico. Las letras diferentes indican las diferencias significativas entre medias. Las flechas (↓↑) indican la dirección de disminución y aumento de la salinidad. N=183.

Con la amplificación con los iniciadores específicos SaNKA F E y SaNKA Sp2 se obtuvo un fragmento de 143 pb, los productos fueron secuenciados y analizados mediante NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.gov/blast>). Dicho fragmento correspondió a la subunidad α de la ATPasa de Na^+/K^+ de *Sphoeroides annulatus* (HQ665505, 100 % de similitud) de acuerdo con Pérez-Robles et al, (2012). El análisis por Q-PCR indicó que las variaciones de salinidad afectaron significativamente ($P > 0.05$) los niveles de expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ en los juveniles de *S. annulatus*, cuyos valores más elevados se presentaron en las

salinidades más altas (41↓, 35↓, 35↑ y 41↑ ups) y el nivel más bajo se presentó a la menor salinidad (17 ups). La respuesta en cuanto al nivel de expresión presenta un comportamiento en forma de “U” con un No. de copias/ng⁻¹ de RNA de 4.20 a 7.43 ± 0.18 en Log₁₀ (Figura 14).

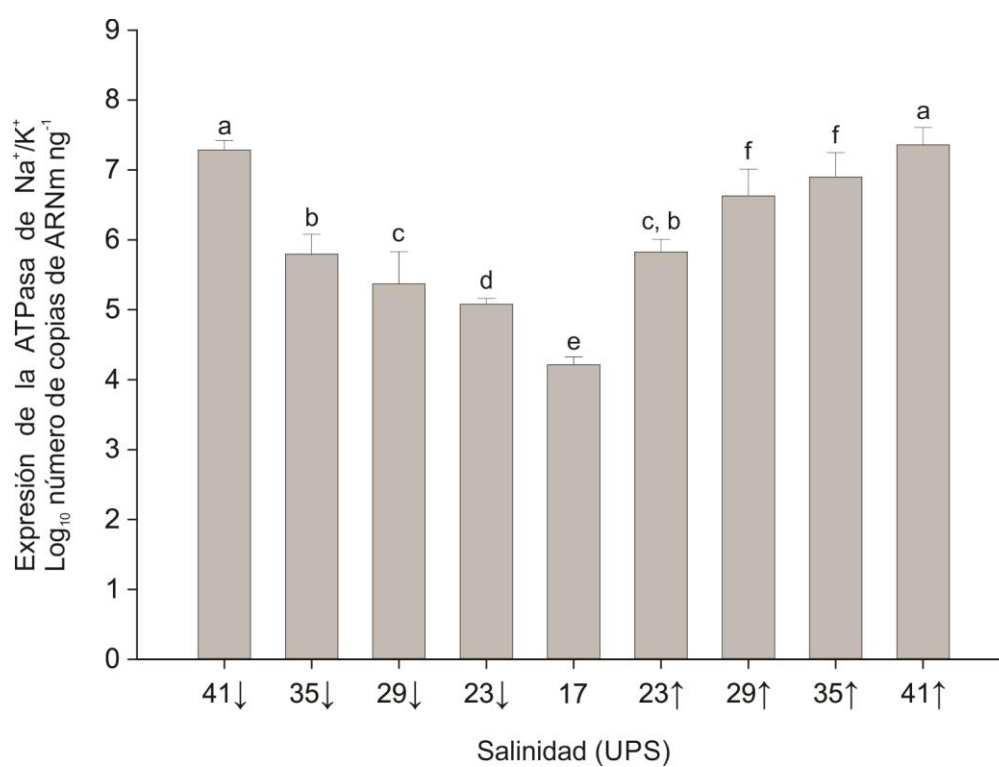


Figura 14. Nivel de expresión de la ATPasa Na⁺/K⁺ de *S. annulatus* basado en el número de copias de ARNm, al ser sometido a cambios graduales de salinidad (media ± DE). Las diferentes letras indican las diferencias significativas entre medias. Las flechas (↓↑) indican la dirección de disminución y aumento de la salinidad. N=90.

DISCUSIONES

De acuerdo con estudios previos realizados en otras especies, la salinidad puede afectar de manera significativa la tasa metabólica de los peces (Haney y Nordlie, 1997a; Gracia-López et al, 2006; Niklitschek y Secor, 2009). Bajo las condiciones experimentales de esta investigación, las variaciones de salinidad si afectaron a la TCO y la TEA en juveniles de *S. annulatus*. De acuerdo con lo propuesto por Kinne, (1967), esta especie presentó el tipo de respuesta 3; donde la tasa metabólica se incrementa tanto en salinidades altas como en bajas. Este resultado contrasta con lo encontrado por Pérez-Robles et al, (2012) para la misma especie, solo que en dicho trabajo los organismos fueron aclimatados a diferentes salinidades durante periodos constantes (22 días en cada salinidad experimental). Bajo esas condiciones, la salinidad no ejerció un efecto significativo con la TCO, la TEA y la relación O:N. Lo que indicó que el botete diana posee gran capacidad para aclimatarse tanto en salinidades bajas como en altas. Sin embargo, podemos constatar ahora que los cambios repentinos de salinidad si afectan negativamente la tasa metabólica, ya que al disminuir la salinidad, tanto la TCO, como la TEA aumentan. Lo que refleja un incremento en la tasa metabólica y de acuerdo a la relación O:N, se presentó estrés bajo estos cambios de salinidad ya que valores de O:N por debajo de 50 indican un catabolismo de proteínas para la obtención de energía. Está documentado que los peces utilizan en primer lugar a las proteínas para la obtención de energía bajo condiciones de estrés, aumentando considerablemente su excreción de

productos nitrogenados, principalmente amonio (Mayzaud y Conover, 1988; da Silva Rocha et al, 2005). Siendo el estrés un factor limitante de crecimiento (Wendelaar Bonga, 1997; Evans, 2010), exponer esta especie a cambios de salinidad persistentemente durante su cultivo puede frenar su crecimiento, ya que el estrés producido por fluctuaciones de salinidad aumentará el catabolismo de proteínas y la tasa metabólica, lo que se reflejará en un aumento en los costos de producción. Al respecto Woo y Kelly, (1995) señalan que en algunas especies eurihalinas, las bajas salinidades provocan un incremento de la demanda energética.

A la fecha no se ha revisado el efecto de cambios graduales de salinidad en otras especies de peces globo. Se ha encontrado que en algunas especies como *Takifugu obscurus* y *T. flavidus* son capaces de soportar cambios de salinidad de agua de mar a agua dulce, pero se desconoce su comportamiento a cambios bruscos de salinidad (Kato et al, 2005). También se ha encontrado en otras especies eurihalinas que la salinidad puede afectar a la TCO, TEA y la relación O:N, por ejemplo; Gracia-López et al, (2006) encontraron que en la baja salinidad (0 y 12 ups) en robalo común (*Centropomus undecimalis*) disminuyó significativamente su TCO y aumentó en salinidades mayores (25 y 35 ups). En similitud a lo encontrado en el presente trabajo, la relación O:N fue menor en salinidades bajas reflejando un mayor nivel de estrés. Otra investigación con resultados similares fue el realizado por Zheng et al, (2008) con el mero banderilla (*Miichthys miiuy*) en donde la salinidad ejerció un efecto significativo sobre estas

mismas variables. Ellos encontraron que en las salinidades más bajas (16 ups) el consumo de oxígeno y la excreción de amonio presentaron los valores más altos; 409 ± 15.96 y 30.14 ± 2.10 respectivamente, en esta misma salinidad se encontró valor más bajo de la relación O:N (11.89 ± 1.98). En *C. parallelus* en las salinidades más bajas (5 ups) la TEA aumentó de manera significativa y disminuyó en 30 ups y esto se reflejó en la relación O:N presentando los valores más altos en las salinidades más bajas en donde se presentó el nivel de estrés más alto (da Silva Rocha et al, 2005).

La presión osmótica de la sangre de los organismos sometidos a variaciones de salinidad permanecieron con variaciones mínimas no significativas ($P > 0.05$). En la Figura 12, se muestra que en relación con el medio externo se obtuvo una pendiente cercana a 0 al momento de disminuir y aumentar la salinidad, lo cual refleja que los juveniles *S. annulatus* son organismos osmorreguladores, ya que una pendiente cercana a 1 indicaría un patrón de osmoconformación (Diaz et al, 2001; Marshall y Grosell, 2006). En el trabajo realizado por Pérez-Robles et al, (2012) con esta especie, se encontró el mismo resultado cuando fue aclimatado a diferentes salinidades constantes. En este estudio, a pesar de que los organismos fueron sometidos a cambios continuos de salinidad, su medio interno permaneció en los intervalos fisiológicos óptimos sin cambios significativos, sin embargo, es evidente que hubo un gasto energético considerable dirigido hacia la osmorregulación ya que los valores de la TCO y la TEA si se vieron incrementados. Se han detectado resultados similares con otras especies

eurihalinas como el molly (*Poecilia latipinna*) (Nordlie et al, 1992) el lenguado (*Paralichthys orbignyanus*) (Sampaio y Bianchini, 2002), y el lenguadillo (*Dicologlossa cuneata*) (Herrera et al, 2009), incluso con *Takifugu rubripes* (Lee et al, 2005) en donde la salinidad no ejerce un efecto significativo con la osmolaridad interna de los organismos, sin embargo, en este trabajo no fue posible encontrar el punto isosmótico ya que la salinidad más baja alcanzada fue de 17 ups por lo que en la Figura 12 se observa que la línea de isosmolaridad (45 °C) no intersecta con la línea de osmorregulación. Además, Pérez-Robles et al, (2012) encontraron que el punto isosmótico de *S. annulatus* está cercano a la salinidad de 10 ups (352 mOsm.kg⁻¹) por lo que en este experimento se debió haber probado con esta salinidad, también encontraron que el punto isosmótico fue muy similar al de otras especies de peces globo como *S. testudineus* y *S. greeleyi* cuyos puntos isosmóticos fueron de 320 y 360 mOsm.kg⁻¹ respectivamente (Prodocimo y Freire, 2004). En la Figura 13 se observa el patrón de osmorregulación de *S. annulatus*, que con las salinidades de prueba solo se observó un patrón de hiposmorregulación, y no se logró observar el patrón de osmorregulación en salinidades más bajas, ya que Pérez-Robles et al, (2012) al haber utilizado una salinidad de aclimatación menor (10 ups) pudieron observar que su patrón de osmorregulación es similar al de otros peces globo como *S. testudineus* y *S. greeleyi* en donde se tiene que a salinidades bajas (4 ups) hiper-osmorregulan y a salinidades mayores (14 y 29 ups) hipo-osmorregulan (Prodocimo y Freire, 2004).

El análisis de expresión de transcritos de la ATPasa Na^+/K^+ por Q-PCR ya ha sido probado con anterioridad en *S. annulatus* y en otras especies, ha demostrado ser un método eficaz y confiable de cuantificación de ARNm (Scott et al, 2004; Tse et al, 2006; Kang et al, 2010; Pérez-Robles et al, 2012). Considerando el comportamiento del nivel de expresión de la ATPasa Na^+/K^+ de los juveniles que fueron sometidos a cambios graduales de salinidad (Figura 15), se puede considerar que existe una estrecha relación con la capacidad osmorreguladora de esta especie, ya que el nivel de expresión estuvo en función de la salinidad; al ir disminuyendo la salinidad hasta la más baja (17 ups) el nivel de expresión disminuye significativamente ($P > 0.05$), y al aumentarla hasta la más alta (41 ups) nuevamente el nivel de expresión aumenta teniendo un comportamiento en forma de “U”, y aunque no se midió el nivel de expresión en el punto isosmótico, este comportamiento podría indicar que en las salinidades cercanas al punto isosmótico el nivel de expresión disminuye. Este comportamiento es similar con *Tetraodon nigroviridis*, en donde el menor nivel de actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ está cercano al punto isosmótico (Lin et al, 2004b). En trabajos previos, se ha encontrado que este comportamiento de expresión en forma de “U” es muy común entre las especies eurihalinas (Jensen et al, 1998; Sampaio y Bianchini, 2002; Deane y Woo, 2004; Laiz-Carrión et al, 2005; Sangiao-Alvarellos et al, 2003; Kang et al, 2008; Herrera et al, 2009).

Pérez-Robles et al, (2012) encontraron que el menor nivel de expresión ATPasa Na^+/K^+ branquial de la de *S. annulatus* está relacionado con las salinidades bajas,

y disminuye considerablemente cerca del punto isosmótico (salinidad de 10 ‰) en donde la osmolaridad del medio externo es similar a la del medio interno, y la cantidad de energía destinada a la osmorregulación activa disminuye. En este estudio se encontró un resultado similar en cuanto al nivel de expresión se refiere, pero contrasta con los resultados obtenidos en el consumo de oxígeno y la excreción de amonio, en donde los valores más altos se presentaron en las salinidades más bajas (Figura 14), esto indicaría que el nivel de la tasa metabólica aumentó, sin embargo, existen otras proteínas involucradas en el transporte de NaCl y K^+ , en este caso co-transportador $Na^+/K^+/2Cl^-$ (NKCC) es de los más importantes, el cual podría estarse expresando en las salinidades bajas y provocando un aumento en el consumo de oxígeno por demanda energética. Además, la relación O:N indicó que los organismos estuvieron estresados por los cambios de salinidad, dicho estrés provoca que aumente la tasa metabólica, la demanda energética y por ende el consumo de oxígeno para mantener la homeostasis (Wendelaar Bonga, 1997) y es evidente que el estrés provocado afectó al consumo de oxígeno y a la excreción de amonio, sin embargo no afectó al nivel de expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ . Es importante considerar que el nivel de expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ en los teleósteos depende de la necesidad de regular las concentraciones de iones dentro de la célula, esta enzima se encarga de mantener los niveles fisiológicos óptimos de Na^+ y K^+ . Al aumentar o disminuir la salinidad; aumenta o disminuye la concentración de iones de Na^+ y Cl^- en el agua, por consiguiente, estos iones pueden atravesar la membrana plasmática de las células de manera pasiva, y para regular las

concentraciones iónicas, la célula invierte energía por medio de la hidrólisis de ATP en el sitio catalítico a la ATPasa de Na^+/K^+ y como se sabe, el ATP disponible para esta tarea proviene en su mayoría del metabolismo de los sustratos energéticos (proteínas, glucosa, lípidos, etc.). Esta enzima es capaz de sacar del citosol al ion Na^+ y al mismo tiempo incorporar hacia el interior al K^+ y ayudar a mantener estable la PO, sin embargo, el ion Cl^- puede ser excretado utilizando el NKCC (Evans, 2010; Kang et al, 2010; Tipsmark et al, 2002). De esta forma se puede establecer una relación entre la salinidad y la energía utilizada en los procesos de osmorregulación, además, esto puede afectar al crecimiento de los peces porque dicha energía ya no es utilizada en el crecimiento.

En general, con los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir que *S. annulatus* responde a los cambios de salinidad manteniendo su concentración osmótica estable, sin embargo, tal efecto provoca que aumente su tasa metabólica por la demanda energética que se requiere para osmorregulación, en base a esto, los juveniles de *S. annulatus* poseen gran capacidad osmorreguladora pero se ven afectados por los cambios bruscos de salinidad lo que le provocó estrés. En el cultivo de esta especie hay que prestar atención a estos cambios repentinos de salinidad y si son frecuentes pueden frenar su crecimiento por medio del estrés provocado. Cabe señalar, que es importante revisar el efecto de la salinidad sobre el desarrollo ontogénico de *S. annulatus*, para determinar en qué etapas clave del desarrollo se adquiere la eurihalinidad, de esta forma se tendrá información adicional para su manejo en cautiverio.

Principales hallazgos

- Los cambios graduales de salinidad afectaron significativamente ($P < 0.05$) al consumo de oxígeno y excreción nitrogenada. Esto se reflejó en un aumento de la tasa metabólica lo que de acuerdo a los valores de la relación O:N (22.20 a 30.44), los organismos se estresaron.
- Los cambios fluctuantes de salinidad no afectaron significativamente ($P > 0.05$) a las PI de los juveniles y permanecieron constantes, esto reflejó que el comportamiento osmorregulador fuera lineal con pendientes cercanas a cero al momento de la disminución y aumento de la salinidad, además, los peces hipo-osmorregularon en salinidades superiores a los 17 ups.
- El análisis de q-PCR indicó que los cambios graduales de salinidad afectaron significativamente a la expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ cuyos valores más altos se encontraron en las salinidades más altas, y los valores menores en las salinidades más bajas, obteniendo una expresión en forma de “U”.
- En base a los resultados obtenidos se concluyó que los juveniles de botete diana no toleran los cambios graduales de salinidad debido a que se expresaron por los mismos, sin embargo, sigue de manifiesto su gran capacidad para mantener sus presiones osmóticas estables lo que refleja un fuerte comportamiento osmorregulador.

Capítulo III

Efecto de la salinidad sobre la osmorregulación durante el desarrollo embrionario del botete diana *Sphoeroides annulatus*.

INTRODUCCIÓN

Se sabe que algunos peces eurihalinos, migran a zonas como lagunas y esteros para desovar, el botete diana lo hace en verano de mayo a julio cuando la temperatura del agua aumenta y los organismos adquieren la madurez gonadal (Álvarez-Cadena et al, 1987; Castro-Aguirre et al, 1999; Sánchez-Cárdenas et al, 2011). Al desovar en estos ambientes fluctuantes, los embriones quedan expuestos a variaciones de salinidad durante su desarrollo y dependiendo del lugar en donde ocurre el desove pueden presentarse diferentes condiciones de salinidad que pudieran comprometer su sobrevivencia. Sin embargo, los embriones de los teleósteos eurihalinos poseen adaptaciones para mantener la osmolaridad interna estable, y debido a que en las primeras etapas del desarrollo no están presentes los principales órganos osmorreguladores como las branquias, los riñones y los intestinos, se ha observado que se desarrolla una gran cantidad de células especializadas en la osmorregulación o ionocitos en todo el cuerpo del embrión y en el saco vitelino (Kato et al, 2000; Kaneko et al, 2002; Varsamos et al, 2002; Sucré et al, 2011). Estas células expresan proteínas especializadas en el balance iónico, como la ATPasa de Na^+/K^+ , el co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ y los canales de Cl^- necesarias para mantener la homeostasis del medio interno (Hiroi et al, 2005; Sucré et al, 2011; Sucré et al, 2012). Sin embargo, el comportamiento osmorregulador y la capacidad osmorreguladora de los peces eurihalinos durante su ontogenia considerando el desarrollo embrionario, desarrollo larvario, y las etapas de juvenil y adulta suelen

no ser iguales (Fridman et al, 2012a; Fridman et al, 2012b; Bodinier et al, 2010b; Yang y Chen, 2006; Varsamos et al, 2005).

Se considera que la salinidad es un factor importante para la incubación de los huevos al afectar directamente el desarrollo embrionario ya que puede retardar el tiempo y porcentaje de eclosión, además de producir malformaciones en las larvas recién eclosionadas (Zhang et al, 2010; Fridman et al, 2012a; Abdo-de la Parra et al, 2012). A pesar de que esta especie tiene un alto valor comercial en México, existe poca información relacionada con las condiciones óptimas para su desarrollo embrionario, sin embargo ya se tiene gran avance en cuanto a la estandarización de los protocolos de producción de larvas e inducción a la maduración en agua de mar (Duncan et al, 2003; Komar et al, 2004; Abdo-de la Parra et al, 2010). Se realizó un trabajo por Abdo-de la Parra et al. (2012), en dónde se evaluó el efecto de la salinidad y la temperatura sobre el desarrollo embrionario con la finalidad de determinar sus intervalos óptimos, tomando en cuenta el porcentaje de eclosión y la supervivencia de larvas del botete diana, en este caso, se encontró que la temperatura óptima para el desarrollo embrionario fue a los 28 °C y el mayor porcentaje de eclosión y supervivencia se obtuvo a las salinidades de 20, 30 y 35 ups. Sin embargo, no se consideró el comportamiento osmorregulador y la capacidad osmorreguladora en las diferentes salinidades de prueba, esta información es necesaria para entender los mecanismos de osmorregulación, lo que permitirá incrementar la información disponible para obtener las condiciones óptimas de su cultivo. Es por ello que en el presente

trabajo se evaluó el efecto de la salinidad (5, 12, 19, 26, 33 y 40 ups) sobre el desarrollo embrionario de *S. annulatus* a temperatura constante ($28\pm 1.5^{\circ}\text{C}$), cuantificando el porcentaje de eclosión, tiempo de eclosión, supervivencia, además de evaluar la presencia de malformaciones en larvas, el patrón de osmorregulación y la capacidad osmorreguladora.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en las instalaciones del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., Unidad Mazatlán (CIAD), con el apoyo de material y equipo de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Ensenada, y el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

Se realizó una cruce de una hembra adulta de 1380 gr de peso y 35.5 cm de longitud corporal con un macho de 1482 gr de peso y 36.3 cm de largo, seleccionados de acuerdo a los protocolos establecidos por el laboratorio de reproducción y cultivo larvario del CIAD, Unidad Mazatlán. El macho fue seleccionado mediante la revisión de la producción de esperma extraído mediante presión abdominal se consideró adecuado cuándo presentó una coloración blanca opaca con alta viscosidad. Para determinar el momento de madurez de la hembra, fue necesario canular y extraer una muestra de los ovocitos directamente de la gónada; los ovocitos de la hembra seleccionada presentaron un tamaño > 0.5 mm de diámetro y el núcleo presentó migración hacia el polo animal. A la hembra se le aplicó un implante de 200 μ g del análogo de la hormona lutenizante (LHRHa; Des-Gly¹⁰, [D-Ala⁶]-Luteinizing hormone-releasing hormone ethylamide), tipo EVAc, para inducir la maduración final y ovulación de los gametos. Una vez suministrada la hormona, la hembra fue colocada en un estanque circular de 7000 L junto con el macho (que no fue

inducido hormonalmente), la pareja fue mantenida con un flujo continuo (~4 volúmenes/día) de agua de mar filtrada y la ovulación ocurrió a las 71 horas después de la inducción.

La fertilización se realizó artificialmente, ambos gametos fueron extraídos por presión abdominal y se mezclaron por dos minutos en un vial utilizando agua de mar (35 ups) filtrada y tratada con luz UV, después se enjuagaron con agua limpia para eliminar el exceso de espermatozoides, posteriormente se eliminó la capa adherente de los huevos fertilizados utilizando una solución de enzima proteolítica proteasa (Sigma-Aldrich®) a una concentración de 5 ml L⁻¹ durante 8 minutos (Rodríguez-Ibarra et al, 2010). Al final del tratamiento los huevos se enjuagaron con agua de mar tratada con UV durante un minuto.

Se seleccionaron siete salinidades de prueba en base al criterio de (Pérez-Robles et al, 2012) . Las salinidades fueron; 5, 12, 19, 26, 33, 35, y 40 ups, para ello se utilizó agua de mar filtrada, tratada con luz UV y diluida con agua dulce potable, de clorinada y tratada con luz UV, la salinidad más alta fue preparada con sal de mar natural. Por cada salinidad, se prepararon tres incubadoras de plástico transparentes tipo Baldor con capacidad para 6L que fueron llenados con 5L de agua a la salinidad correspondiente, dichos recipientes fueron colocados de manera aleatoria en el área de experimentación. En cada jarra se colocaron 10 g de huevos fertilizados (~65,000 huevos) y se incubaron a 28 ± 1.5 °C, proporcionándoles aireación constante para mantener el oxígeno disuelto > 6

mg.L⁻¹, no se les suministró cambio continuo de agua, se reemplazó el 50% del agua cada ocho horas durante el tiempo que duró el experimento (55 horas).

Una vez transcurrido el tiempo de incubación embrionaria (45 h), se evaluó el porcentaje de eclosión, de supervivencia y de larvas normales, para esto, se tomaron tres muestras al azar utilizando una cámara Bogorov de 7mL de capacidad, se realizaron dos repeticiones de este procedimiento. La cámara tipo Bogorov es un dispositivo que permite obtener una muestra de agua de manera instantánea, y es muy útil para muestreo de zooplancton (Vinogradov, 1997). Las muestras se colocaron en un matraz de 250 mL y se contaron las larvas y los huevos presentes, para posteriormente extrapolar a un litro (Álvarez-Lajonchère y Hernández-Molejón, 2001). Los porcentajes de eclosión, porcentaje de supervivencia y porcentaje de larvas normales se calcularon de acuerdo a las siguientes formulas (Ibarra-Castro et al, 2012):

$$PE = [(LV + LM) * 100] / (LV + LM + H)$$

$$PS = (LV * 100) / (LV + LM)$$

$$PD = (LD * 100) / LN$$

$$PN = (LN * 100) / LV$$

donde PE es el porcentaje de eclosión, PS; el porcentaje de supervivencia, PD; porcentaje de larvas deformes, PN; porcentaje de larvas normales, LV; número de larvas vivas, LN; número de larvas normales, LM; número de larvas muertas y H; el número de huevos. Se midió la longitud total de 20 larvas de cada unidad

experimental (tres repeticiones por cada tratamiento) después de ser fijadas en solución de Davidson, utilizando un microscopio óptico con micrómetro ocular de 25 μm de precisión.

Se determinó el tiempo de eclosión en horas de las larvas en cada uno de los tratamientos, y se consideró como tiempo inicial el momento en el que los huevos fertilizados fueron colocados en los recipientes de incubación, y el tiempo final como el momento en el que aproximadamente el 5% de los embriones habían eclosionado. Se midió la presión osmótica de los fluidos embrionarios en diferentes tiempos del desarrollo embrionario; 16, 21, 27, 36, 45 y 47 horas después de la fertilización al ser expuestos a las salinidades de prueba. Para esto, se cuantificó la presión osmótica de 15 embriones en cada estadio y por cada tratamiento. Los embriones fueron secados superficialmente con papel secante y se sumergieron en aceite de inmersión para evitar la deshidratación, se utilizó un capilar de vidrio modificado para obtener las muestras de fluido embrionario. La presión osmótica de las muestras se comparó en referencia a la presión osmótica del medio y dos estándares (250 y 500 mOsm.kg^{-1}) para determinar la capacidad osmorreguladora (CO). En este proceso, se utilizó un nanosmómetro (Otago Nanosmometer) que requirió un máximo de 20 nL de muestra. Los resultados se expresaron en mOsm.kg^{-1} , y la CO se calculó mediante la diferencia entre la presión osmótica de los embriones con la del medio externo (Lignot et al, 2000).

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una vía para determinar el efecto de la salinidad sobre cada una de las variables analizadas previa determinación de normalidad y homoscedasticidad de los datos. Los datos de las variables expresadas en porcentaje fueron transformados a arcoseno para su análisis. Cuando se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) se realizaron pruebas Tukey para la comparación entre medias. Los datos no paramétricos fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis por rangos y prueba de Dunn para la comparación entre medias ($P < 0.05$). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software SigmaPlot v12 para Windows.

RESULTADOS

El efecto de salinidad sobre el porcentaje de eclosión (PE), porcentaje de supervivencia (PS), porcentaje de larvas normales (PN), porcentaje de larvas deformes (PD) y tiempo de eclosión (TE) se presentan en la Tabla IV. La salinidad ejerció un efecto significativo para el PE ($P < 0.05$) entre los tratamientos. Se observó que el PE en la salinidad de 5 ups fue el más bajo (2.6 ± 0.32) y diferente del resto de las salinidades probadas. Mientras que el control a 35 ups, presentó el PE más alto ($93.8 \% \pm 0.56$) de todos los tratamientos. Sin embargo el PE en las salinidades de 26, 33 y 40 ups no presentó diferencias significativas ($P > 0.05$). Sin embargo, es evidente que para salinidades abajo de 26 ups, se observó un efecto significativo sobre la eclosión de los embriones (Tabla IV). Después de dos horas de que las larvas eclosionaron se determinó el PS, se detectó que en la salinidad de 5 ups se encontró el PS más bajo ($7.8 \% \pm 0.88$), y a partir de 12 ups el PS aumentó tres veces con respecto al obtenido en 5 ups. Para salinidades de 19, 26, 33 y 40 ups el PS fue similar. Notablemente el tratamiento control (35 ups) presentó el PE más elevado ($97.43 \% \pm 0.73$) siendo doce veces mayor que el obtenido en 5 ups ($P < 0.05$). El porcentaje de las larvas deformes (PD) fue más alto en la salinidad de 5 ups ($26.67 \% \pm 7.54$) ($P < 0.05$), mientras que en el resto de las salinidades no se observó deformidad, obteniendo un 100 % de larvas normales. La salinidad ejerció un efecto significativo en el tiempo de eclosión ($P < 0.05$). En salinidades de 5, 12 y 40 se registró un TE > 50 h post-fertilización, pero diferente de la salinidad de 5 ups ($P > 0.05$). El TE y

el PE para las salinidades de 19 y 26 ups fue similar, sin embargo, el control a 35 ups eclosionó a las 45.5 ± 0.10 h post-fertilización (Tabla IV). Además, los datos indicaron que la salinidad control (35 ups) no modificó ninguna de las variables, siendo esta la salinidad de mantenimiento y maduración de los reproductores.

Tabla IV. Efecto de la salinidad sobre la eclosión de *S. annulatus*. Porcentaje de eclosión; PE, porcentaje de sobrevivencia; PS, porcentaje de larvas normales; PN, porcentaje de larvas deformes; PD y tiempo de eclosión; TE, en horas tomadas a partir de la fertilización. Letras diferentes indican diferencias significativas entre salinidades ($P < 0.05$).

Salinidad (ups)	PE (%)	PS (%)	PN (%)	PD (%)	TE (h)
5	$2.6^a \pm 0.32$	$7.78^a \pm 0.88$	$70.37^a \pm 7.75$	$26.67^a \pm 7.54$	$55.53^a \pm 0.59$
12	$69.9^b \pm 1.25$	$89.40^b \pm 1.22$	$100^b \pm 0$	$0^b \pm 0$	$51.10^b \pm 0.10$
19	$80.4^c \pm 1.15$	$93.21^c \pm 0.78$	$100^b \pm 0$	$0^b \pm 0$	$47.20^c \pm 0.10$
26	$87.1^d \pm 0.90$	$93.66^c \pm 0.96$	$100^b \pm 0$	$0^b \pm 0$	$47.03^c \pm 0.15$
33	$89.7^d \pm 0.93$	$96.47^c \pm 0.59$	$100^b \pm 0$	$0^b \pm 0$	$46.27^d \pm 0.25$
35	$93.8^e \pm 0.56$	$97.43^d \pm 0.73$	$100^b \pm 0$	$0^b \pm 0$	$45.50^e \pm 0.10$
40	$85.8^d \pm 1.56$	$89.59^c \pm 1.22$	$100^b \pm 0$	$0^b \pm 0$	$51.13^b \pm 0.15$

Los patrones de osmorregulación de las diferentes etapas del desarrollo embrionario que se estudiaron en *S. annulatus* se muestran mediante ecuaciones lineales (Tabla V). Los resultados indicaron que todas las etapas del desarrollo embrionario presentaron una pendiente cercana a 0, es decir, las presiones

osmóticas en este caso permanecieron sin cambios significativos (Figura 15). El punto isosmótico en cada uno de los estadios se determinó de acuerdo a la línea de osmorregulación y la línea de isosmolaridad (línea de 45°), siendo el punto isosmótico (PI) el punto en el que estas dos líneas se interceptaron. En este caso, el PI fue diferente en cada una de las etapas estudiadas con un intervalo de 342.8 a 435.5 mOsm.kg⁻¹ (12 a 15.3 ups). Se detectó que el menor PI ocurrió a 47 h DF. Este patrón de osmorregulación mostró una pendiente de 0.146 (Tabla V).

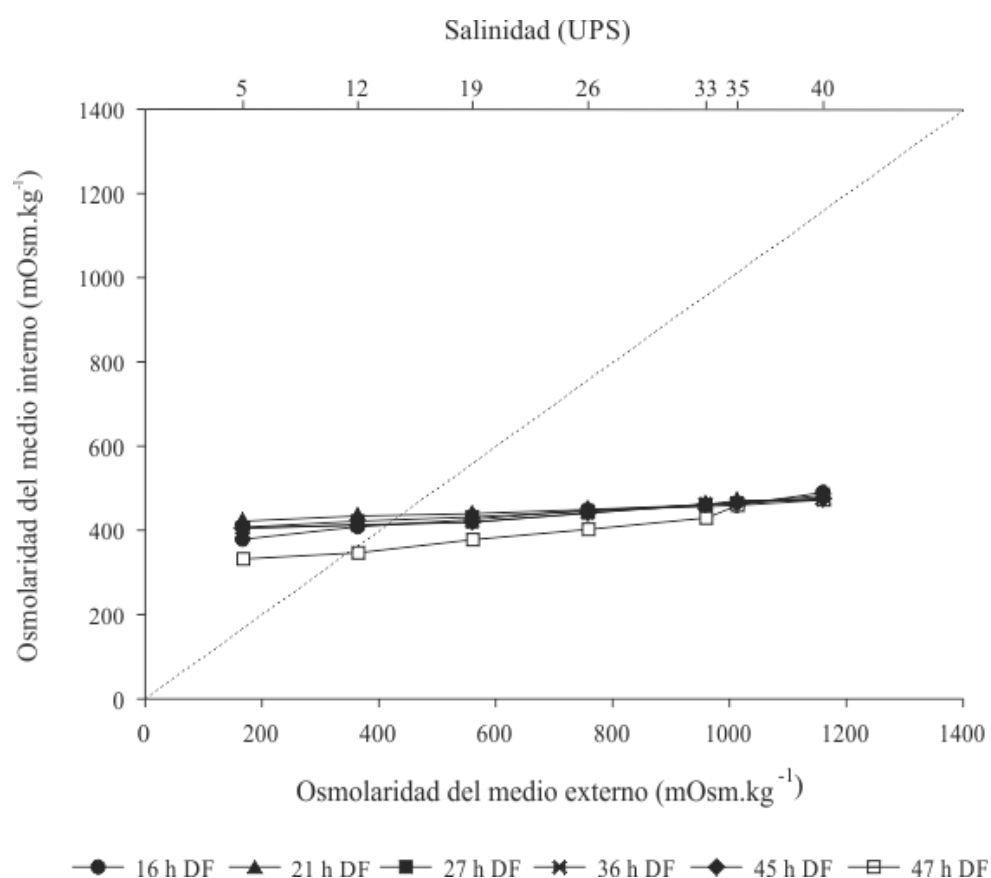


Figura 15. Patrones de osmorregulación de embriones desde la fecundación (hora 0) hasta el inicio de la eclosión (hora 47). La línea de 45 ° representa la isosmolaridad.

Tabla V. Punto isosmótico de los embriones de *S. annulatus* en diferentes etapas de su desarrollo. MI; osmolaridad de la sangre, ME; osmolaridad del medio externo. DF, Después de la fertilización. R^2 , índice de regresión lineal de Pearson. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las horas post-fertilización.

Horas (DF)	Ecuación de la recta	R^2	Punto isosmótico (mOsm.kg ⁻¹)
16	MI = 367.413 + (0.0995 * ME)	0.968	409.4 ^a
21	MI = 393.752 + (0.0715 * ME)	0.987	435.5 ^a
27	MI = 413.095 + (0.0514 * ME)	0.974	424.4 ^a
36	MI = 393.306 + (0.0718 * ME)	0.985	415.3 ^a
45	MI = 385.532 + (0.0767 * ME)	0.963	410.2 ^a
47	MI = 298.816 + (0.1460 * ME)	0.976	342.8 ^b

Las letras diferentes indican las diferencias significativas.

Respecto al comportamiento de la presión osmótica interna de los embriones desarrollados en diferentes tratamientos de salinidad y tomando en cuenta cada una de las etapas del desarrollo que se estudiaron, los resultados señalaron que a 5 ups la PO en promedio fue de 271.5 mOsm.kg⁻¹. En el resto de las salinidades la PO fue similar; aumentando solo a partir de las 21 h DF, y disminuyó en el momento en el que los organismos eclosionaron en la hora 47 DF. La PO de los organismos fue diferente ($P < 0.05$) en cada una de los estadios, incrementando de manera directa con la salinidad (Figura 16).

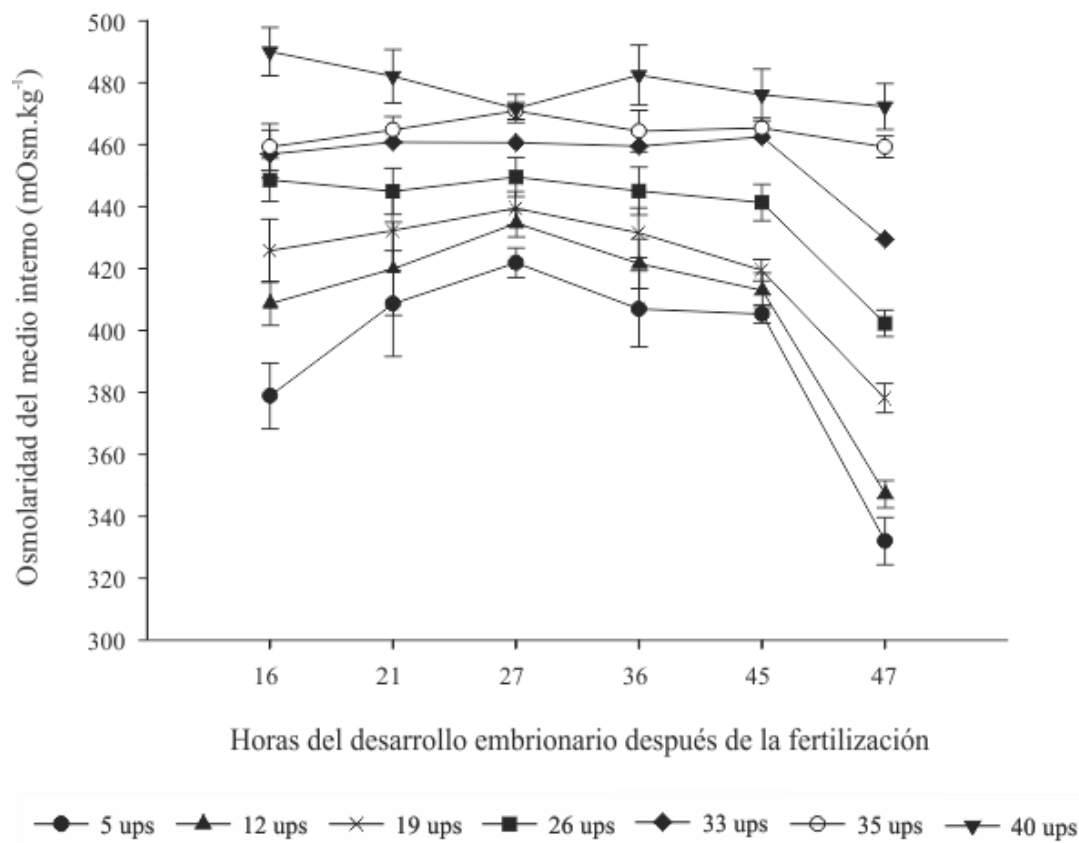


Figura 16. Comportamiento de la osmolaridad de los embriones en cada salinidad de prueba tomando en cuenta el tiempo post-fertilización.

Los embriones desarrollados en 5 y 12 ups presentaron una osmolaridad de (343 mOsm.kg^{-1}) se observó un comportamiento de hiposmorregulación, en donde la concentración osmótica interna de los embriones fue menor a la del medio externo. De igual manera se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las capacidades osmorreguladoras de los organismos por efecto de la salinidad (Figura 17). Estos resultados de CO indicaron que desde su desarrollo embrionario el botete diana es capaz de mantener homeostasis osmótica en salinidades desde 5 hasta 40 ups.

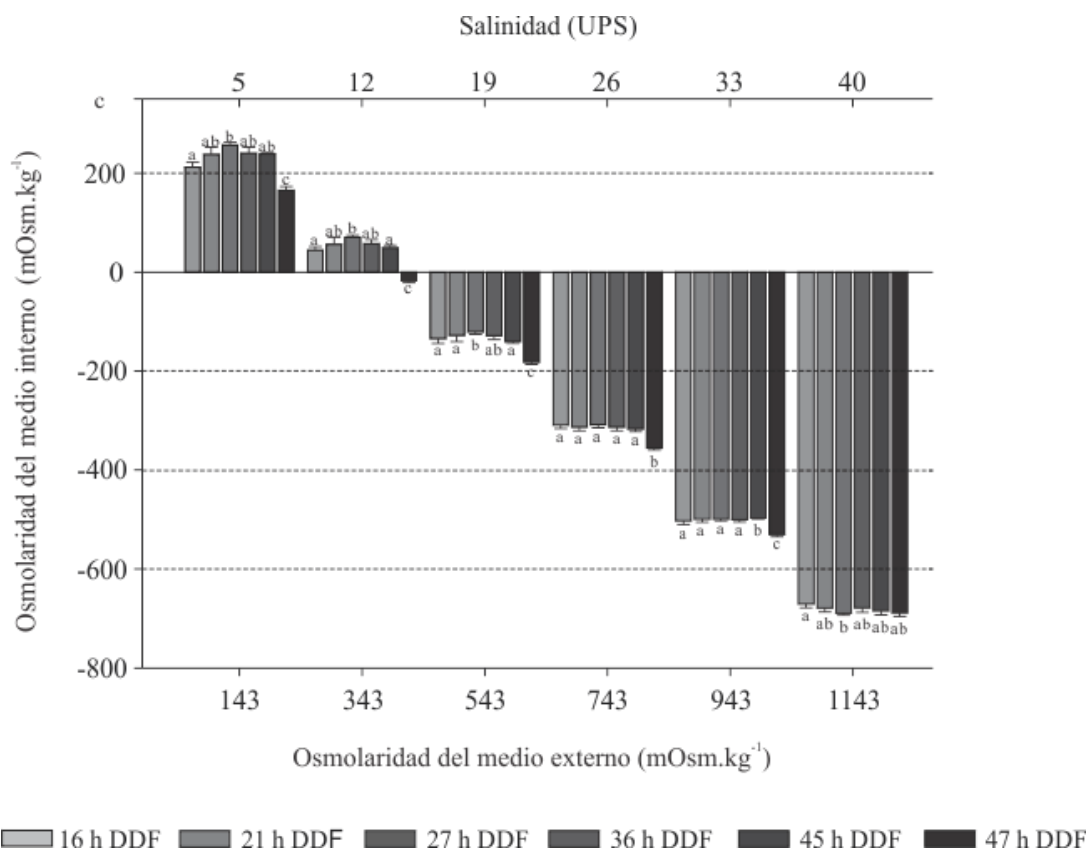


Figura 17. Capacidad osmorreguladora de los embriones de *S. annulatus* en cada etapa del desarrollo analizada. A; 16 h DDF, B; 21 h DDF, C; 27 h DDF, D; 36 h DDF, E; 45 h DDF, F; 47 h DDF (2 horas después de la eclosión). DDF, después de la fertilización. Letras diferentes indican diferencias significativas entre salinidades ($P > 0.05$).

Únicamente se detectaron malformaciones en los organismos expuestos a la salinidad de 5 ups en algunos embriones (26.71 %), en el resto de los tratamientos, no se encontró evidencia de que la salinidad haya producido ningún efecto visible. En el panel I de la Figura 18, se aprecian embriones al momento de la eclosión (esquema A, 45 HDF) y dos horas después de la eclosión (esquema B, 47 HDF) en la salinidad control de 35 ups, en este caso, no se

encontró evidencia de malformaciones, y los embriones lograron eclosionar de manera normal. En cambio, en el panel II se aprecian embriones cuyo desarrollo embrionario de realizó en la salinidad de 5 ups, se aprecia que en el esquema C la mayoría de los embriones no lograron eclosionar, y los que sí lograron hacerlo (55 HDF) presentaron malformaciones en la espina dorsal y en la parte cefálica, además, no presentaron movilidad alguna, al cabo de tres horas murieron (esquema D). En el resto de las salinidades probadas los embriones se desarrollaron normalmente, sin embargo, la salinidad si ejerció un efecto significativo sobre el TE y el PS. Los embriones expuestos a 5 ups fueron los que más tardaron en eclosionar, y al momento de romper el corión la mayoría de los embriones murieron y al cabo de tres horas la mortalidad fue del 100 %.

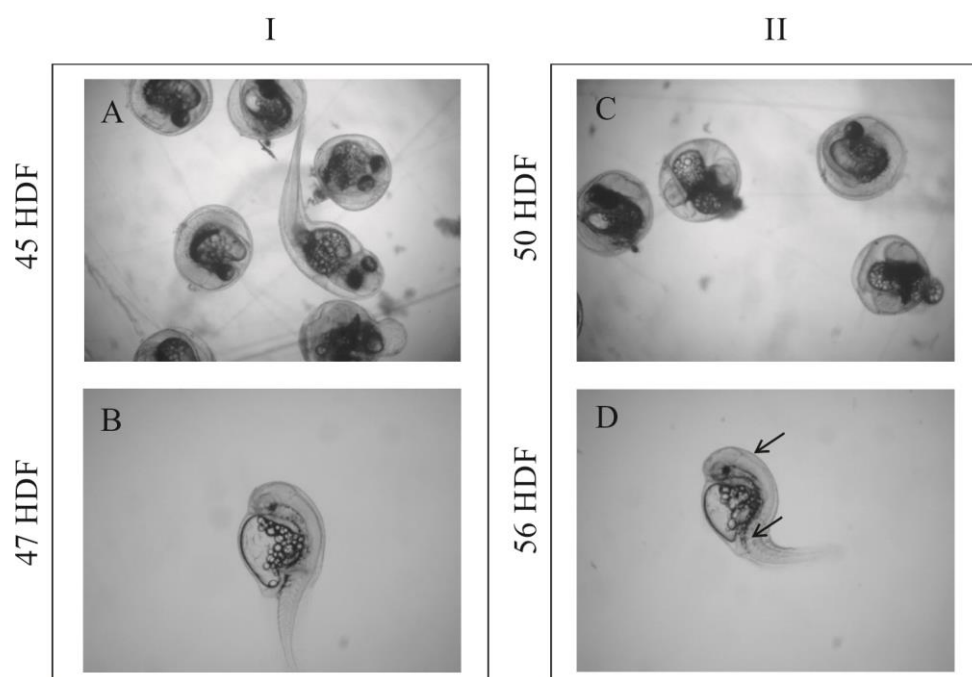


Figura 18. Diferencias morfológicas en el desarrollo embrionario de *S. annulatus*. Panel I; desarrollo a 35 ups: A, embriones en el momento de la eclosión (45 HDF), B, larva recién eclosionada (47 HDF). Panel II; desarrollo a 5 ups: C, embriones a punto de eclosionar (50 HDF), D, larva deforme recién eclosionada (54 HDF). HDF, horas post-fertilización, las flechas indican las malformaciones.

DISCUSIONES

Los embriones de peces están protegidos del medio externo por el corión, el cuál forma una barrera impermeable a la mayoría de los solutos y esto les permite mantener su PO constante en diferentes condiciones de salinidad. Sin embargo al momento de la eclosión, las larvas quedan expuestas a las condiciones externas y dependen de sus CO para sobrevivir (Kucera et al, 2002). En este trabajo se demostró que algunos embriones logran desarrollarse normalmente a 5 ups, sin embargo, la mayoría (97.4 %) no eclosionaron y los que sí lograron hacerlo murieron al cabo de tres horas. Resultados similares obtenidos por (Abdo-de la Parra et al, 2012) corroboran esta respuesta la cuál esta relacionada con la falta de desarrollo de las branquias en las larvas por lo que la actividad osmorreguladora es limitada (Sánchez-Cárdenas et al. 2011). Además, no se han realizado estudios detallados sobre la organogénesis durante el desarrollo embrionario y larvario del botete diana, sin embargo, en este estudio se pudo observar que después de los 2 DDE, cuando las larvas abren la boca, el comportamiento osmorregulador comienza a ser más estable lo que se refleja en un aumento en la capacidad osmorreguladora en general, esto puede ser una evidencia de que las branquias han comenzado a tener un papel importante en la osmorregulación.

Otros órganos como la piel realizan la mayoría de las funciones osmorreguladoras en los peces (Evans et al, 1999; Kucera et al, 2002; Sánchez-

Cárdenas et al, 2011; Varsamos et al, 2005). *S. annulatus*, no fue capaz de regular su PO interna en 5 ups, las larvas no soportaron el cambio de salinidad y esto se reflejó en las variaciones de su concentración osmótica (Figura 16). El incremento notable en el porcentaje de eclosión y el porcentaje de supervivencia (69.9 % y 93.21 % respectivamente) ocurrió a partir de la salinidad de 12 ups que sugiere que algún órgano sostiene esta función, probablemente la piel funciona como el principal órgano osmorregulador durante las primeras horas después de la eclosión como ocurre en otros peces, ya que se observó que las branquias comienzan a desarrollarse después del 2 DDE. Diversos estudios analizan la capacidad de osmorregulación de la piel y las branquias pseudo desarrolladas en las larvas de peces eurihalinos, en estos trabajos se expone la importancia de los ionocitos o células ricas en mitocondrias o también llamadas clorocitos, estas células se expresan en mayor cantidad en las branquias, sin embargo, también se localizan en la piel y otros órganos que participan en la osmorregulación como el riñón o el tubo digestivo (Varsamos et al, 2001; Varsamos et al, 2005).

Por otra parte, los tiempos de eclosión que se encontraron en este trabajo fueron menores a los reportados por Abdo-de la Parra et al. (2012), ya que en dicho trabajo la eclosión terminó alrededor de la hora 96 después de la fertilización (HDF), y en este estudio los embriones terminaron de eclosionar en la mitad del tiempo a las 47 HDF. También existieron diferencias en cuanto al porcentaje de eclosión (PE), ya que en este estudio fueron mayores al 60% a partir de la salinidad de 12 ups. En ambos estudios la temperatura de incubación fue similar

($28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $28 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$). Estas diferencias pueden ser debidas al cuidado y manejo de los organismos durante la etapa experimental, es decir, la calidad del agua, aeración, incidencia de luz e higiene pudieron afectar al PE, además, el estado de salud y madurez sexual de los reproductores influyó directamente en la calidad del huevo, de acuerdo a lo encontrado por Sánchez-Cárdenas et al, (2011).

Sucré et al, (2012) realizaron un estudio de inmunolocalización de la Na^+/K^+ ATPasa el co-transportador de cloro (NKCC) y el regulador transmembranal de fibrosis quística (CFTR), en embriones de *D. labrax*, en dicho trabajo se encontró que los embriones expuestos a agua de mar diluida (5% de agua de mar) tuvieron la capacidad de regular el flujo y el balance hídrico debido a mecanismos fisiológicos compensatorios, el CFTR y el NKCC se observaron dentro de los ionocitos en el saco vitelino y el tegumento de las hendiduras branquiales (Sucré et al, 2012). Sería de utilidad corroborar si *S. annulatus* posee proteínas similares que le permitan soportar bajas salinidades durante su desarrollo embrionario y la eclosión, su localización en etapas clave de su desarrollo embrionario aydarían a establecer la adaptación salina del botete con relación a la organogenesis y el desarrollo branquial.

Por otro lado Zhang et al, (2010) revisaron el efecto de la salinidad sobre el desarrollo embrionario y larvario de *Takifugu flavidus*, un pez globo asiático que pertenece a la misma familia que *S. annulatus*. Expusieron los peces a salinidades desde 0 hasta 45 ups y al igual que en este estudio, la salinidad

ejerció un efecto significativo sobre el PE; en salinidades < 5 ups el PE fue menor al 70% y en 0 ups los embriones no eclosionaron, establecieron que el intervalo óptimo de desarrollo para esta especie es de entre 10 y 20 ups. Este resultado es muy similar al que se encontró en *S. annulatus* presentando prácticamente las mismas respuestas a la salinidad. Sin embargo, contrastando con el mismo estudio, dichos autores detectaron que la salinidad afectó de manera significativa el tiempo de eclosión, y reportaron que los embriones eclosionaron después de las 100 HDF. En *S. annulatus* la salinidad si afectó al TE de los embriones pero el tiempo fue mucho menor (50 horas menos) al reportado en *T. flavidus* (Tabla I), esta diferencia pudo deberse a que utilizaron temperaturas menores de incubación (21 a 22.5°C), considerando que la temperatura óptima para el cultivo de *T. flavidus* es de 23 a 26°C y para *S. annulatus* de 28°C (Shi et al, 2011; Reyes et al, 2011).

Pérez-Robles et al, (2012) revisaron la capacidad y el patron de osmorregulación en juveniles de botete diana, encontraron que esta especie puede tolerar bajas y altas salinidades, presentando un patron de osmorregulación con una pendiente cercana a cero, lo que indica un patrón de osmorregulación fuerte (Diaz et al, 2001; Marshall y Grosell, 2006). En este trabajo se encontró que los embriones también presentaron la capacidad de osmorregulación similar a la de los juveniles debido a la presencia del corión. Las pendientes encontradas representan los patrones de osmorregulación de las etapas analizadas, las cuales fueron cercanas a cero, sin embargo los niveles de la PO de la sangre de los embriones

fue más alta que la PO de los juveniles (Pérez-Robles et al, 2012). Esto se atribuye parcialmente a la dificultad que se presentó para poder obtener los fluidos internos de los embriones, es decir, no fue posible extraer exclusivamente la sangre de los embriones, en su lugar, se extrajo todo el contenido intracorionico el cual incluye la sangre; vitelo, grasa, agua y quizá fluidos intra celulares, y de acuerdo con Varsamos et al, (2005) esto hace que la la presión osmótica de estas muestras fuera mayor. También Yanagie et al, (2009) señalan que estos valores altos se deben a la acumulación de productos metabólicos del catabolismo del vitelo por parte del embrión. Como lo señala Sucre et al, (2012) este tipo de resultados, en donde la presión osmótica de los embriones o de las larvas recién eclosionadas es mayor que la de los adultos o juveniles han sido reportados para otras especies como *Oncorhynchus keta* (Kaneko et al, 1995), *Hippoglossoides platessoides* (Lønning y Davenport, 1980), y en *O. mossambicus* (Yanagie et al, 2009). Sin embargo, debido a que los análisis no son comparativos entre tiempos de muestreo, podemos considerarlos como razonables hasta los 550 mOsm.kg⁻¹.

Por otra parte, en este estudio se encontró que la salinidad si ejerció un efecto significativo ($P < 0.05$) sobre la PO de los embriones de botete diana en las diferentes etapas analizadas, en cada salinidad, la PO disminuyó al momento de la eclosión (hora 47). Sucre et al, (2012) encontraron que en los embriones de *D. labrax* expuestos al agua de mar la PO fue de 418 ± 17 mOsm.kg⁻¹, mayor al

encontrado en los adultos 360 ± 13 mOsmol.kg⁻¹ bajo las mismas condiciones (Nebel et al, 2005), presentando el mismo patrón que *S. annulatus*.

Se han llevado a cabo estudios similares en la tilapia (*Oreochromis niloticus*), uno de los mas recientes es el realizado por Fridman et al, (2012a) en donde revisaron el efecto de la salinidad sobre la eclosión, supervivencia, crecimiento y la absorción del saco vitelino. Al tratarse de una especie de origen dulce acuicola, el comportamiento de las variaciones de la PO contrasta con los reportados en este estudio, aunque la salinidad ejerció un efecto sobre las PO durante el desarrollo embrionario, los embriones de esta especie no toleraron las altas salinidades, sin embargo, tanto *S. annulatus* como *O. niloticus* presentaron una capacidad osmorreguladora similar de hiper-osmorregulación en bajas salinidades e hipo-osmorregulación en altas.

En este estudio se encontró que las salinidades pueden producir malformaciones en las larvas recién eclosionadas en *S. annulatus*, la mortalidad después de tres horas post-eclosión en los embriones desarrollados a 5 ups fue del 100 %, las larvas que lograron eclosionar presentaron malformaciones en la parte cefálica y caudal, aunque después de la eclosión se mantuvieron vivas por un tiempo y no presentaron movimiento. En otros estudios como el realizado por Fridman et al, (2012a) en larvas de tilapia (*O. niloticus*) las salinidades superiores a 17.5 ups produjeron malformaciones en la parte caudal, cefálica, y abdominal, además, presentaron hemorragias internas. Esta documentado que en larvas de otras especies como en el managatsuo (*Pampus punctatissimus*), la anguila japonesa

(*Anguilla japonica*), y en el pargo australiano (*Pagrus auratus*), la salinidad afecta significativamente el desarrollo de las larvas produciendo malformaciones. En el caso de *P. punctatissimus* las salinidades superiores a 40 ups produjeron deformidad en las larvas (Shi et al, 2008). Para *A. japonica* se encontró que a salinidades inferiores a 33 ups se incrementó la incidencia de edemas en la parte cefálica, sin embargo, en la salinidad de 42 ups aumentó considerablemente el número de larvarvas con curvaturas en la médula espinal (Okamoto et al, 2009). En el pargo australiano (*P. auratus*) la salinidad afectó al crecimiento, las larvas obtuvieron menores tamaños en las salinidades de 15 y 45 ups, además, se encontró que al aumentar la salinidad se incrementó la incidencia de calculos renales lo que afectó a la sobrevivencia, dichos calculos renales se formaron aparentemente por la incapacidad de las larvas por eliminar solutos por la vía urinaria (Fielder et al, 2005). Como lo señalan Kaneko y Hiroi, (2008) los procesos de osmorregulación en las primeras etapas de vida de los teleósteos los llevan a cabo células especializadas en los epitelios, conforme las larvas se van desarrollando, otros órganos como las branquias, los intestinos y los riñones adquieren un papel importante en dichos procesos, sin embargo en todos los casos se debe de invertir energía para llevarlos a cabo. Bajo condiciones normales, en estas etapas del desarrollo el mayor porcentaje de la energía se invierte en el crecimiento, desarrollo y maduración de los órganos, sin embargo, si las larvas se ven en la necesidad de invertir un porcentaje considerable de esta energía en procesos de osmorregulación, el desarrollo larvario no se efectuará satisfactoriamente, por lo que el déficit de energía provocará que los órganos no

se desarrollen adecuadamente, que no maduren, que las larvas no crezcan y que aumente la mortalidad, además, el fallo en los procesos de osmorregulación puede destruir tejidos sencibles como los capilares, lo que provocará edemas, hemorragias y vésiculas de líquido en diferentes partes del cuerpo de las larvas, como lo encontró Fridman et al, (2012b) en la tilapia

Los resultados obtenidos sugieren que *S. annulatus* tolera un amplio rango de salinidades durante su desarrollo embrionario, sin embargo es importante mencionar que a salinidades inferiores a 26 ups el PE disminuyó significativamente ($P < 0.05$). La salinidad de 35 ups no afectó ninguna de las variables estudiadas. El hecho de que, las presiones osmóticas no cambien durante el desarrollo embrionario, demuestra que el corión en el embrión de *S. annulatus* le da protección contra los cambios osmóticos externos, ya que al momento de la eclosión, los embriones presentaron una menor CO. Sin embargo, los resultados sugieren que esta especie puede desarrollarse aceptablemente a partir de 26 ups.

Los resultados indican que la salinidad de 35 ups no afectó significativamente ninguna de las variables estudiadas, y de acuerdo a nuestros resultados, la salinidad de mantenimiento y maduración de los reproductores (35 ups), tendrá un efecto directo sobre la viabilidad de los embriones. Por otro lado, las presiones osmóticas en las etapas del desarrollo permanecieron sin variaciones significativas, esto demuestra que durante el embrión de *S. annulatus* está protegido de las variaciones de salinidad del medio externo, por el corión, el cual

parece ser la principal estructura de osmorregulación que mantiene estable el medio interno del embrión. Los resultados también indican que los embriones al momento de la eclosión presentaron una menor capacidad de osmorregulación, ya que al romper el corión, el embrión queda desprotegido y enfrenta de manera directa a las condiciones externas, iniciando la osmorregulación por sí solo. Por lo tanto los resultados sugieren que la especie *S. annulatus* puede desarrollarse aceptablemente a partir de salinidades de 19 ups.

El desarrollo embrionario de *S. annulatus* está influenciado por la salinidad, esta especie demostró soportar bajas y altas salinidades, sin embargo la supervivencia de las larvas recién eclosionadas se vio afectada a 5 ups. Además, en esta misma salinidad alrededor del 26.6% de las larvas que eclosionaron presentaron malformaciones, en las demás salinidades los embriones tuvieron un desarrollo normal.

La PO de los embriones es más alta que la de las larvas recién eclosionadas y la de los juveniles, debido a la dificultad que se tiene para obtener las muestras de sangre necesarias para medir la concentración de solutos (Sucré et al, 2012). Sin embargo, se encontró que las PO de los fluidos corporales de los embriones, y por otro lado, las variaciones de las concentraciones osmóticas fueron diferentes en algunas etapas del desarrollo. Los embriones presentaron un patrón de osmorregulación eurihalino ya que mostraron una pendiente cercana a cero, sin embargo, el punto isosmótico presentó algunas variaciones en las diferentes etapas del desarrollo, encontrando el más bajo en el momento de la eclosión

(342.8 mOsm.kg⁻¹), y en las demás etapas no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$). Al igual que otras especies eurihalinas y con los juveniles de esta especie, los embriones de *S. annulatus* hiper-osmorregulan en bajas salinidades (<12 ups) e hipo-osmorregulan en altas.

En presente estudio es el primero que se realiza en alguna de las especies de la familia *Tetraodontidae* de importancia comercial. Nuestros resultados tienen implicaciones importantes en acuicultura, ya que se determinó que el desarrollo embrionario de esta especie puede efectuarse desde 12 a 40 ups presentando un porcentaje de eclosión y de supervivencia altos. En base a los resultados, se puede utilizar agua de menor salinidad para eliminar la presencia de algunos hongos que llegan afectar el desarrollo de los embriones, puesto que al someterlos a cambios bruscos de salinidad, estos patógenos pueden ser eliminados sin afectar a los embriones.

Principales hallazgos

- La salinidad afectó significativamente el PE ($P > 0.05$), esto significó que en la salinidad de 5 ups las larvas presentaron dificultades para eclosionar ya que presentaron un PE de 2.6 %, por lo que no es recomendable incubar embriones de botete en esta salinidad, sin embargo, a partir de la salinidad de 19 ups el PE está por arriba del 80 %, y a partir de esta salinidad los embriones pueden eclosionar adecuadamente.
- EL PS se vio afectado por la salinidad ($P > 0.05$), el menor valor se encontró en la salinidad de 5 ups (7.78 %) por lo que no se recomienda mantener larvas a esta salinidad.
- La salinidad influyó en el tiempo que las larvas tardaron en desarrollarse y eclosionar, el TE mayor fue de 55.5 horas en la salinidad de 5 ups y el menor en la salinidad de 35 (45.5 horas).
- Los embriones de botete diana demostraron tener la capacidad de osmorregular, ya que sus PO permanecieron constantes durante el desarrollo embrionario, en este caso, se especula que el corión fungió como principal estructura osmorreguladora. Los PI variaron de 342.8 a 435.5 mOsm.kg⁻¹.
- En todas las salinidades estudiadas, los embriones fueron capaces de hiper-osmorregular en salinidades de 5 y 12 ups, y de hipo-osmorregular a partir de la salinidad de 19 ups en cada hora que se analizó. Sin embargo, al momento de eclosionar, las larvas no sobreviven en 5 ups y tienen dificultades para hacerlo en 12 ups.

Capítulo IV

**Osmorregulación y tolerancia a la salinidad en el desarrollo larvario del
botete diana *Sphoeroides annulatus*.**

INTRODUCCIÓN

Está documentado que el botete *diana S. annulatus* desova en primavera-verano de mayo a junio dentro de estuarios y desembocaduras de ríos, en estos ambientes ocurren variaciones de salinidad durante la temporada de lluvias, y en la temporada de secas la evaporación puede hacer que la salinidad en estos cuerpos de agua aumente considerablemente (Álvarez-Cadena et al, 1987; Castro-Aguirre et al, 1999; Sánchez-Cárdenas et al, 2011; Blaber, 2012; Komar et al, 2004). Las larvas de los peces que desovan en dichos ambientes fluctuantes, presentan adaptaciones que les permiten soportar estos cambios de salinidad y temperatura. Algunas de estas adaptaciones son las células especializadas en la osmorregulación llamadas ionocitos, las cuales permiten a los organismos mantener su presión osmótica estable y sobrevivir en estos ambientes fluctuantes. Estas células están presentes en órganos implicados en la osmorregulación, como las branquias, piel, riñón y tracto digestivo (Katoh et al, 2000; Kaneko et al, 2002; Varsamos et al, 2002; Sucré et al, 2011). Se ha encontrado que en los peces, las branquias no están bien desarrolladas durante la eclosión y la piel funciona como principal órgano osmorregulador (Bodinier et al, 2010b).

En el caso de *S. annulatus* existen pocos trabajos enfocados a su ecofisiología durante el desarrollo larvario, sin embargo se han realizado algunos estudios importantes en juveniles donde se revisó el efecto de la salinidad y la temperatura sobre el crecimiento, osmorregulación, consumo de oxígeno, excreción de

amonio y la expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ . Los juveniles de pez globo tienen gran capacidad para soportar cambios abruptos de salinidad y temperatura (Reyes et al, 2011; Pérez-Robles et al, 2012), sin embargo como en muchas otras especies de peces eurihalinos ésta se adquiere progresivamente (Fridman et al, 2012a; Fridman et al, 2012b; Bodinier et al, 2010b; Yang y Chen, 2006; Varsamos et al, 2005). En embriones de botete, la salinidad y la temperatura ejercen un efecto significativo sobre el porcentaje de eclosión y la supervivencia (Abdo-de la Parra et al, (2012), siendo 28 °C la temperatura optima de desarrollo y a partir de 50 ups las larvas no se desarrollaron adecuadamente. A la fecha, no se han realizado estudios enfocados a evaluar el efecto de la salinidad durante el desarrollo de larva a juvenil en esta especie. Conocer las estrategias adaptativas de las especies permite ampliar el conocimiento sobre los modelos evolutivos. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar el efecto de la salinidad constante y fluctuante (5, 12, 19, 26, 33, 35 y 40 ups) sobre el desarrollo larvario de *S. annulatus* a una temperatura constante ($28 \pm 0.5^\circ\text{C}$), analizando el porcentaje de supervivencia, la tasa de crecimiento, los patrones de osmorregulación y su capacidad osmorreguladora.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en las instalaciones del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., Unidad Mazatlán (CIAD), con el respaldo de material y equipo de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Ensenada, y del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

En este trabajo se realizaron dos experimentos; el primero (experimento A) para evaluar el efecto de la salinidad de aclimatación constante (5, 12, 19, 26, 33, 35 y 40 ups) durante el desarrollo larvario desde la eclosión hasta la etapa de juvenil (28 días) a una temperatura de $28 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Se analizó el crecimiento, porcentaje de supervivencia, osmorregulación y la capacidad osmorreguladora (CO). Para esto, la fertilización de los huevos se realizó en agua de mar (35 ups) y una vez que los huevos fueron fecundados se sometieron de manera inmediata a las salinidades de prueba para que se desarrollasen los embriones. El segundo experimento (B) se diseñó para investigar el efecto de cambios bruscos de salinidad de larvas aclimatadas a 35 ups al ser expuestas de manera inmediata a salinidades de 5, 12, 19, 26, 33, y 40 ups con temperatura de $28 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Se analizaron las mismas variables que en el experimento A.

En ambos experimentos se consideraron diferentes etapas del desarrollo larvario; eclosión, abertura de la boca, 7, 14, 21 y 28 siete días después de la eclosión DDE. Se utilizaron larvas recién eclosionadas, obtenidas a partir de la cruce de

una hembra (1380 gr de peso y 35.5 cm de longitud corporal) y un macho (1482 gr de peso y 36.3 cm de largo) sexualmente maduros. Los reproductores fueron seleccionados de acuerdo a su grado de madurez siguiendo los protocolos establecidos por el laboratorio de reproducción y cultivo larvario del CIAD, Unidad Mazatlán (Chávez-Sánchez et al, 2008). De un lote de reproductores, tanto el macho y la hembra fueron seleccionados de acuerdo a su madures sexual de la siguiente manera: el macho fue seleccionado mediante la revisión de la producción de esperma (extraído mediante presión abdominal). Se consideró adecuado cuándo presentó una coloración blanca opaca con alta viscosidad. La hembra fue seleccionada de acuerdo a las características de los ovocitos; los cuales presentaron un tamaño > 0.5 mm de diámetro y el núcleo presentó migración hacia el polo animal, para ello fue necesario canular y extraer una muestra de los ovocitos directamente de la gónada. A la hembra seleccionada se le aplicó un implante de 200 μ g del análogo de la hormona lutenizante (LHRHa; Des-Gly¹⁰, [D-Ala⁶]-Luteinizing hormone-releasing hormone ethylamide), tipo EVAc, para inducir la maduración final y ovulación de los gametos. Una vez suministrada la hormona, la hembra fue colocada en un estanque circular de 7000 L junto con el macho (que no fue inducido hormonalmente), la pareja fue mantenida con un flujo continuo (~ 4 volúmenes/día) de agua de mar filtrada y la ovulación ocurrió a las 71 horas después de la inducción.

La fertilización se realizó artificialmente, ambos gametos fueron extraídos por presión abdominal y se mezclaron por dos minutos en un vial de 1L utilizando

agua de mar (35 ups) filtrada y tratada con luz UV, después se enjuagaron con agua limpia para eliminar el exceso de esperma, posteriormente se eliminó la capa adherente de los huevos fertilizados utilizando una solución de enzima proteolítica proteasa (Sigma-Aldrich®) a una concentración de 5 ml.L⁻¹ durante 8 minutos (Rodríguez-Ibarra et al, 2010). Posteriormente se realizaron observaciones al microscopio óptico para verificar el éxito de la fecundación, se consideró como fertilizados a aquellos huevos que presentaron un patrón de pre-división en el polo animal de acuerdo con Kimmel et al, (1995). Finalmente los huevos fertilizados se enjuagaron con agua de mar tratada con UV durante un minuto, posteriormente se pesó por triplicado 0.1 g para contar de manera manual el número de huevos y poder extrapolar a las cantidades necesarias para los experimentos.

Para el experimento A (aclimatación gradual) se utilizaron 21 tanques de 300 L de capacidad llenados con agua a las salinidades de prueba; 5, 12, 19, 26, 33, 35, y 40 ups, para ello se utilizó agua de mar diluida con agua dulce de clorinada, filtrada y tratada con luz UV, la salinidad más alta fue preparada con sal de mar. En cada tanque se colocaron alrededor de 22,000 larvas recién eclosionadas y se mantuvieron a 28 ± 0.5 °C, se les proporcionó aireación constante para mantener el oxígeno disuelto > 6 mg.L⁻¹, se realizaron recambios continuos de agua, remplazando el 50% del volumen total cada 24 horas. Los organismos se mantuvieron en estas condiciones por 28 días, ya que se ha considerado en trabajos previos que a esta edad las larvas ya han llegado a la etapa de juveniles,

transcurrido este tiempo se dio por terminado el experimento (García-Gasca et al, 2006; Nuñez-Vazquez et al, 2012; Abdo-de la Parra et al, 2012).

Durante los 28 días que duró cada experimento se realizaron un total de cinco muestreos, tomando datos biométricos de los organismos como; longitud (mm) y peso (mg), además, se registró la salinidad empleando un refractómetro de mano (ATAGO® Tokyo, Japan), la temperatura y oxígeno se midió utilizando un oxímetro YSI 55 (Yellor Spring Instruments, Yellow Springs, OH, USA), se midieron las presiones osmóticas (PO) de 15 organismos cada siete días con la ayuda de un nanosmometro (Otago Nanosmometer). Para mantener las larvas en condiciones óptimas de cultivo, se alimentó utilizando el método de agua verde que consta de micro algas (*Nanochloropsis sp.*), rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y nauplios de artemia (*Artemia salina*) suministrados de la siguiente manera: del primer al quinto día después de la eclosión se suministró a las larvas una mezcla de rotíferos (10 org/mL) y micro algas (200 mil cel/mL), posteriormente del día 6 al 15 DDE; 20 org/mL y 400 mil cel/mL, del día 16 al 25 DDE; 25 org/mL y 450 mil cel/mL, del día 20 al 25 DDE; nauplios de artemia (0.5 nauplios/mL), posteriormente del día 26 al 33 DDE; 1 nauplio/mL, del 30 al 48 DDE; alimento balanceado en pellets (skreting 0.8 y 1.2 mm, Proaqua, México) 100 gr/día con 60 % de proteína.

Para el experimento B (cambios bruscos de salinidad), se cultivaron alrededor de 150 mil larvas en un tanque de 7,000 L de capacidad, mantenidos a una salinidad promedio de 35 ups utilizando agua de mar filtrada con suministro constante, las

larvas se cultivaron a una temperatura de 28 ± 0.5 °C y diariamente se midió temperatura y salinidad. Se eligieron diferentes etapas del desarrollo larvario para realizar los experimentos: eclosión, abertura de la boca, siete días después de la eclosión (DDE), 14 DDE, 21 DDE, y 28 DDE. Las larvas se cultivaron utilizando un protocolo de alimentación distinto el cual consistió en utilizar micro algas (*Nanochloropsis sp.*), rotíferos (*Brachionus plicatilis*) además de nauplios de artemia (*Artemia salina*) suministrados de la siguiente manera: del primer al segundo día después de la eclosión se suministró a las larvas una mezcla de rotíferos (3 org/mL) y micro algas (700 mil cel/mL), posteriormente del día 3 al 4 DDE; 11 org/mL y 800 mil cel/mL, al día 5 DDE; 19 org/mL y 850 mil cel/mL, del día 6 al 7 DDE; 26 org/mL y 1 millón cel/mL, del 8 al 9 DDE; 27 org/mL, 1 millón cel/mL y 0.5 gr de alimento comercial balanceado en forma de harina (Hotohime; Proaqua, México) de 60% de proteína, del día 10 al 13 DDE; 29 org/mL, 840 mil cel/mL y 0.5 gr de alimento balanceado, de los días 14 al 16 DDE; 29 org/mL, 900 mil cel/mL y 0.75 gr de alimento balanceado, del día 17 al 21 DDE; 6 org/mL, nauplios de artemia (5 nauplios/10 mL) y seis raciones de alimento balanceado 0.2 gr en pellets (skreting de 0.8 y 1.2 mm; Proaqua; México), de los días 21 al 24 DDE; 5 nauplios/10 mL y 11 gr de alimento balanceado, posteriormente de los días 25 al 28 DDE; 30 gr de alimento comercial en seis raciones, de los días 29 al 30 DDE; 85 gr de alimento balanceado en seis raciones, y del día 30 al 38 DDE; 150 gr de alimento balanceado distribuido en seis raciones. Para realizar las pruebas de cambios bruscos de salinidad, se utilizaron incubadoras de plástico transparente tipo Baldor con capacidad para 6 L que fueron llenados con

5 L de agua a la salinidad correspondiente, dichos recipientes fueron colocados de manera aleatoria en el área de experimentación. En cada jarra se colocaron 200 organismos de cada etapa del desarrollo en cuestión, este procedimiento se realizó por triplicado, y se les realizó una biometría (Ibarra-Castro et al, 2012), las larvas se mantuvieron a una temperatura promedio de 28 ± 1.5 °C, se les proporcionó aireación constante y se mantuvieron en estas condiciones por 72 horas. Durante este tiempo, se realizaron once muestreos (3, 8, 16, 24, 32, 36, 40, 48, 56, 62 y 70 horas), se colectaron 15 organismos de cada unidad experimental para ser preservados en RNA later y solución de Davidson para posteriores análisis, se midieron las PO de 10 organismos vivos de cada unidad experimental para determinar la capacidad osmorreguladora (CO), demás, se midió el porcentaje de supervivencia.

Para determinar la CO de los organismos en cada uno de los experimentos, las muestras se compararon en referencia a la presión osmótica del agua en la que se encontraban al momento del muestreo y dos estándares de 250 y 500 mOsm.kg⁻¹). Las mediciones se realizaron con un nanosmómetro (Otago Nanosmometer) que requirió 20 nL de muestra. Los resultados se expresaron en mOsm.kg⁻¹, y la CO se calculó mediante la diferencia entre la presión osmótica de los embriones con la del medio externo (Lignot et al, 2000). En ambos casos, se determinó el porcentaje de supervivencia con la ecuación (Ibarra-Castro et al, 2012):

$$PS = (LV * 100)/(LV + LM)$$

dónde, PS; porcentaje de supervivencia, LV; número de larvas vivas y LM; número de larvas muertas.

Para determinar el efecto de la salinidad sobre cada una de las variables analizadas en ambos experimentos, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) tomando en cuenta pruebas de normalidad y homoscedasticidad de los datos. Cuando se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) se realizaron pruebas Tukey para la comparación entre medias. Los datos no paramétricos que no presentaron normalidad, fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis por rangos y pruebas de Dunn para la comparación entre medias ($P < 0.05$). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software SigmaPlot v12 para Windows.

RESULTADOS

En el experimento A (aclimatación gradual) se revisó el efecto de seis salinidades (12, 91, 26, 33, 35 y 40 ups) sobre el crecimiento, sobrevivencia y osmorregulación, y se encontró que la exposición a salinidad constantes ejerce un efecto significativo ($P < 0.05$) sobre la sobrevivencia y la osmoregulación. Sin embargo, se determinó que las salinidades de prueba no afectaron de forma consistente en el crecimiento de las larvas ya que desde la eclosión hasta los 28 DDE hubo diferentes comportamientos. En Figura 19 se observa que existieron algunas diferencias significativas en algunas etapas del desarrollo, pero este comportamiento no es consenso en las demás etapas, es decir, en las primeras etapas del desarrollo (eclosión, apertura de la boca y 7 DDE) no hubo diferencias significativas en la mayoría de las salinidades ($P > 0.05$), y las larvas alcanzaron un tamaño de alrededor de dos milímetros cuyo crecimiento en estas etapas fue más lento, posteriormente, a los 14 DDE dicho crecimiento aumentó considerablemente alcanzando un tamaño de 3.5 a 4 mm, y en esta etapa del desarrollo solo se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la salinidad de 40 ups. A los 21 días después de la eclosión (DDE), las larvas alcanzaron un tamaño de 5 a 6 mm, y de igual manera, solo se encontraron algunas diferencias significativas con respecto a la salinidad de 40 ups. En la última etapa analizada (28 DDE), las larvas crecieron a un tamaño final de 8 a 10 mm en promedio y presentaron menor tamaño en las salinidades de 19 y 33, sin embargo, en las demás etapas no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$).

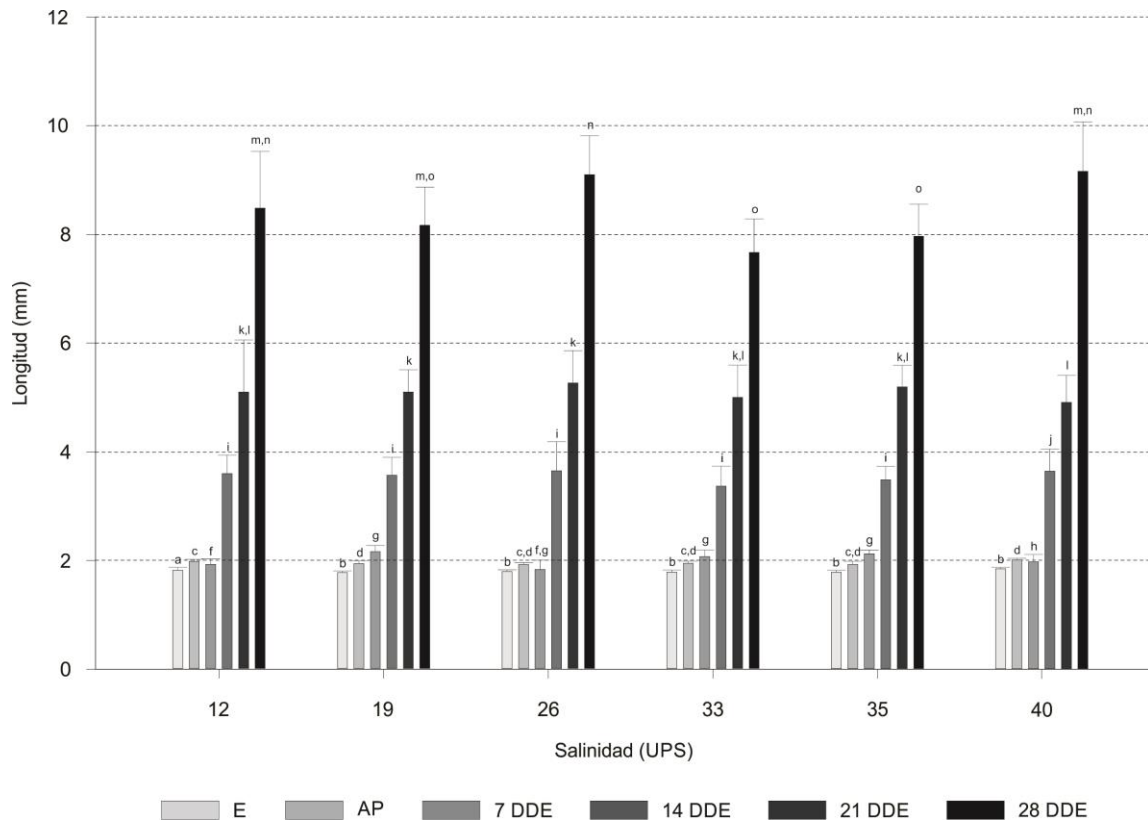


Figura 19. Crecimiento de las larvas post-eclosión por efecto de la salinidad a temperatura constante (28 ± 0.5 °C). E; eclosión, AP; apertura de la boca, DDE; días después de la eclosión. Las letras diferentes indican las diferencias significativas encontradas ($P < 0.05$). N=951.

La salinidad afectó de manera significativa la sobrevivencia ($P < 0.05$) en cada etapa larvaria que se analizó, y en general se presentó una tendencia negativa. En la Figura 20 se observa que dicha sobrevivencia disminuyó drásticamente de un 90% en el momento de la eclosión, hasta aproximadamente un 3% a los 28 DDE cuando las larvas alcanzaron la etapa de juvenil. Los organismos cuyo desarrollo embrionario se realizó en una salinidad de 5 ups lograron eclosionar, sin embargo, al cabo de una hora presentaron una mortalidad del 100%, por lo

que no fue posible analizar su sobrevivencia. Tomando en cuenta el efecto de las salinidad en cada etapa analizada, se encontraron diferencias significativas a partir del segundo día después de la eclosión cuando los organismos abrieron la boca, ya que la sobrevivencia disminuyó hasta un 45 a 57 %, posteriormente al 7 DDE bajó hasta un 18 a 25 %, cabe señalar que para este día los intestinos, riñones y el páncreas ya se encuentran desarrollados (García-Gasca et al, 2006), al 14 DDE se presentó un porcentaje del 9 a 16.5%, a los 21 DDE osciló de 4.2 a 8.2 %, y finalmente en el último día del análisis a los 28 DDE la sobrevivencia fue de 0.3 a 3.4%. Se aprecia en la Figura 20 que en general los porcentajes de sobrevivencia más bajos ocurrieron en la salinidad de 40 ups, presentando un comportamiento de disminución del 91.8% en el momento en que los organismos eclosionaron a un 45.2% cuando abrieron la boca, posteriormente a un 18.2% a los 7 DDE, 9.3% en los 14 DDE, 4.2% a los 21 DDE y 3% a los 28 DDE.

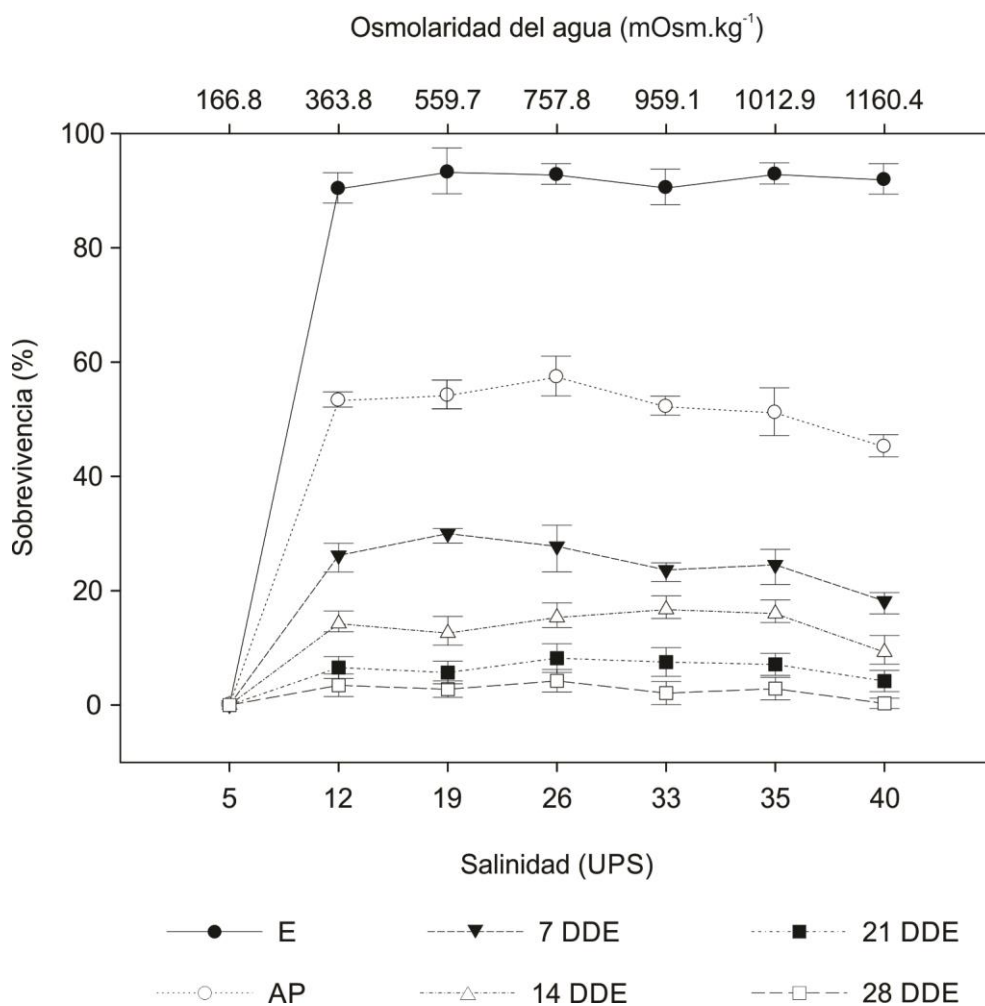


Figura 20. Efecto de la salinidad sobre los porcentajes de sobrevivencia en cada etapa del desarrollo larvario estudiada. E; eclosión, AP; apertura de la boca, DDE; días después de la eclosión. En la salinidad de 5 ups la sobrevivencia fue del 0%.

El comportamiento osmorregulador de las larvas en salinidades constantes se presenta en la Figura 21, en todos los casos, se obtuvo una pendiente cercana a cero y los puntos isosmóticos fueron similares a los encontrados en trabajos previos, en este caso para las larvas recién eclosionadas su punto isosmótico fue de 350.2 mOsm.kg⁻¹, al momento de la apertura de la boca bajó a 338.9

mOsm.kg⁻¹, posteriormente a los 7 DDE, 14 DDE, 21 DDE y 28 DDE los puntos isosmóticos se encontraron en 342.1, 342.4, 348.9 y 355.9 mOsm.kg⁻¹ respectivamente, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$), dichos puntos isosmóticos fueron cercanos a la salinidad de 12 ups. Se aprecia que al momento de la eclosión, las larvas presentaron mayor dificultad para mantener su medio interno estable, debido a que entre la relación entre el medio externo (agua) con el medio interno (sangre) presentó el valor de la pendiente más alto (0.156), ya que más cercano sea este valor a 1, más se acerca al comportamiento de osmoconformación (Marshall y Grosell, 2006). Al momento en el que las larvas abrieron la boca, no se observó una diferencia significativa ($P > 0.05$) con respecto al comportamiento de osmorregulación de los organismos recién eclosionados, sin embargo, al cabo de 7 DDE, se observó una diferencia significativa ($P < 0.05$) con respecto a las dos etapas anteriores, además la pendiente disminuyó a 0.083 acercándose más al valor 0, mostrando un comportamiento fuerte de osmorregulación. A los 14, 21 y 28 DDE este comportamiento de osmorregulación se hizo más evidente ya que el valor de dichas pendientes se acercó aún más a 0 y fue de; 0.024, 0.014, 0.008, respectivamente. Las fluctuaciones de los valores de las PO en las larvas desde la eclosión hasta la etapa de juvenil (28 DDE) se muestran en la Figura 22 en dónde los valores de las PO se estabilizaron conforme las larvas aumentaron de edad, de tal manera que en las larvas eclosionadas las PO fueron las más altas en todas las salinidades (de 349.8 a 470.6 mOsm.kg⁻¹) y las PO de los juveniles fueron las más estables a los 28 DDE (de 348.1 a 357.1 mOsm.kg⁻¹).

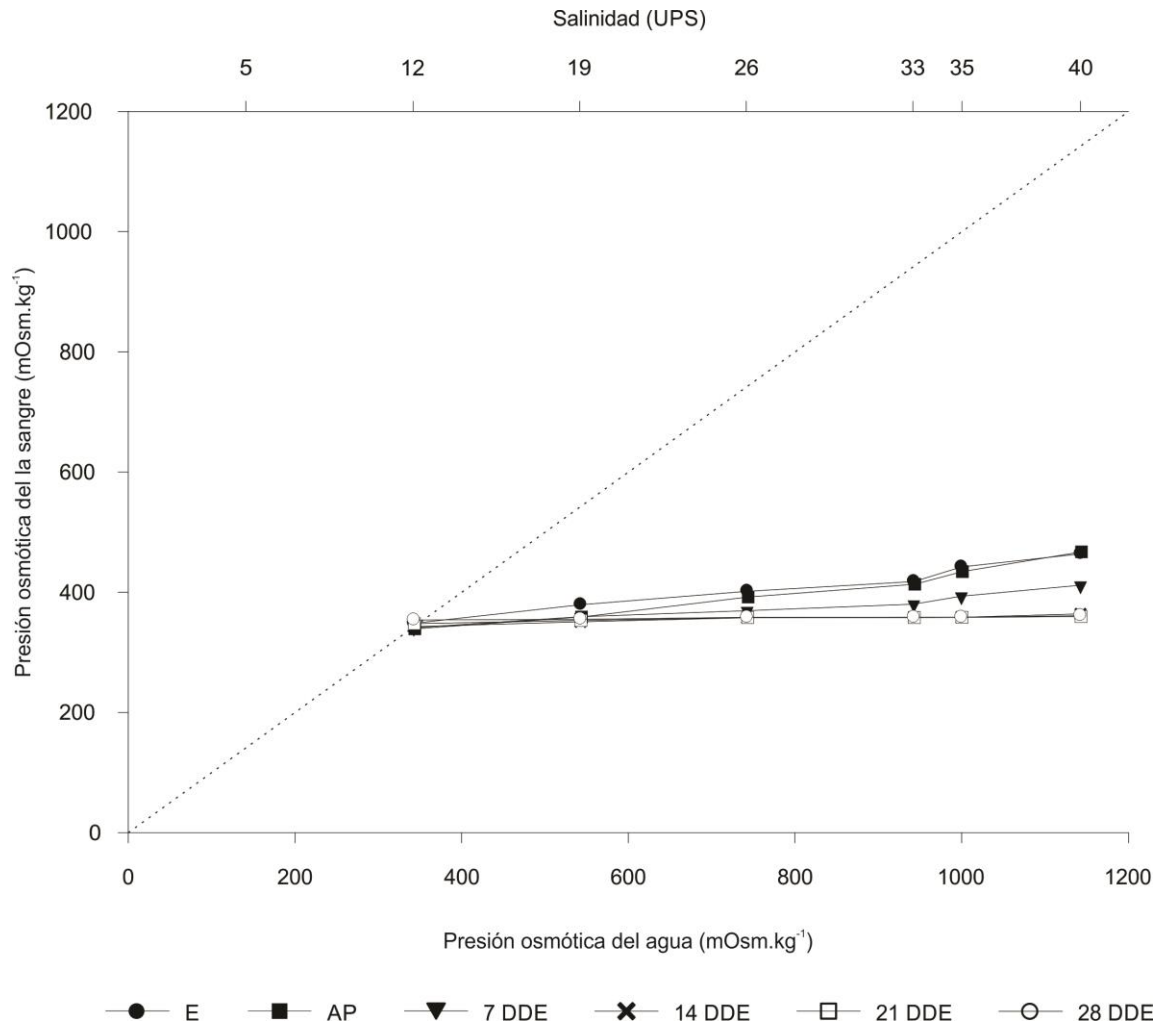


Figura 21. Comparación de las presiones osmóticas de la sangre de las larvas en diferentes estadios del desarrollo embrionario con respecto a las presiones osmóticas del agua de cultivo, a temperatura constante (28 ± 0.5). E; eclosión, AP; apertura de la boca, DDE; días después de la eclosión. La línea de 45° representa la isosmolaridad.

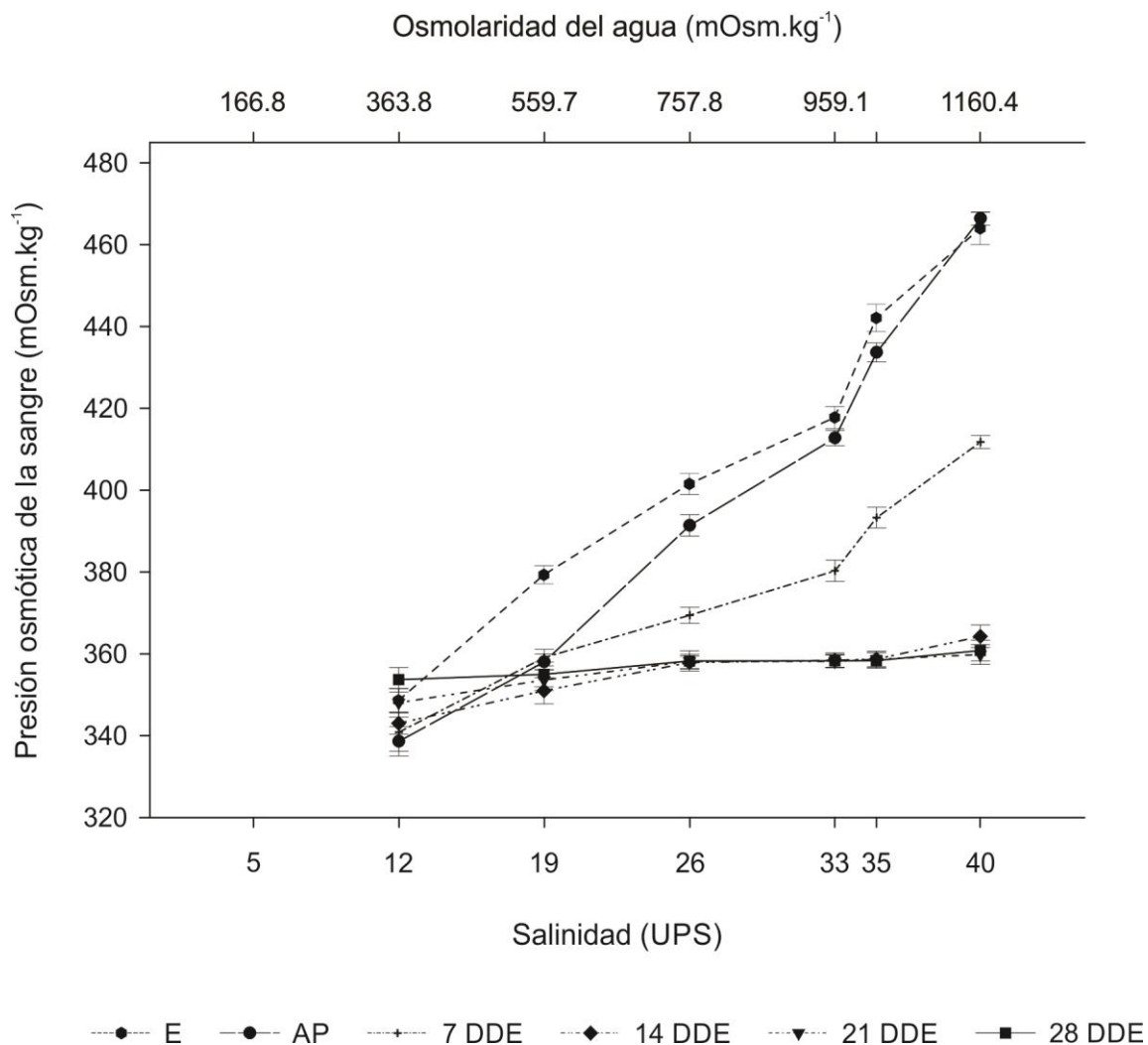


Figura 22. Efecto de la salinidad sobre las presiones osmóticas de la sangre de larvas de *S. annulatus* en diferentes estadios de desarrollo. E; eclosión, AP; apertura de la boca, DDE; días después de la eclosión.

La CO se muestra en la Figura 23, en ella se aprecia que fue diferente en cada etapa analizada y se vio influenciada por la salinidad ($P < 0.05$). En la salinidad de 12 ups se observó en general un comportamiento de hiperosmorregulación en las etapas de eclosión, 14, 21, y 28 DDE, lo que indicó que la sangre de las larvas presentaron una mayor presión osmótica con respecto al agua de mar, sin

embargo, en las etapas de apertura de la boca y 7 DDE, presentaron un valor negativo, lo que indicó un comportamiento de hiperosmorregulación. Posteriormente, a partir de la salinidad de 19, todas las etapas presentaron un comportamiento de hiperosmorregulación, el cuál oscilo de $-200 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ hasta $-800 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ en la salinidad de 40 ups. Este resultado indica que las larvas de *S. annulatus* presentaron una gran capacidad para mantener su medio interno estable, independientemente de la etapa del desarrollo en que se tratase, además, se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre dichas etapas, aunque en general presentaron la misma tendencia en la CO, y en este caso, cuando las larvas estaban más jóvenes tuvieron una menor CO, y con forme se acercaron a la etapa de juvenil dicha CO fue aumentando.

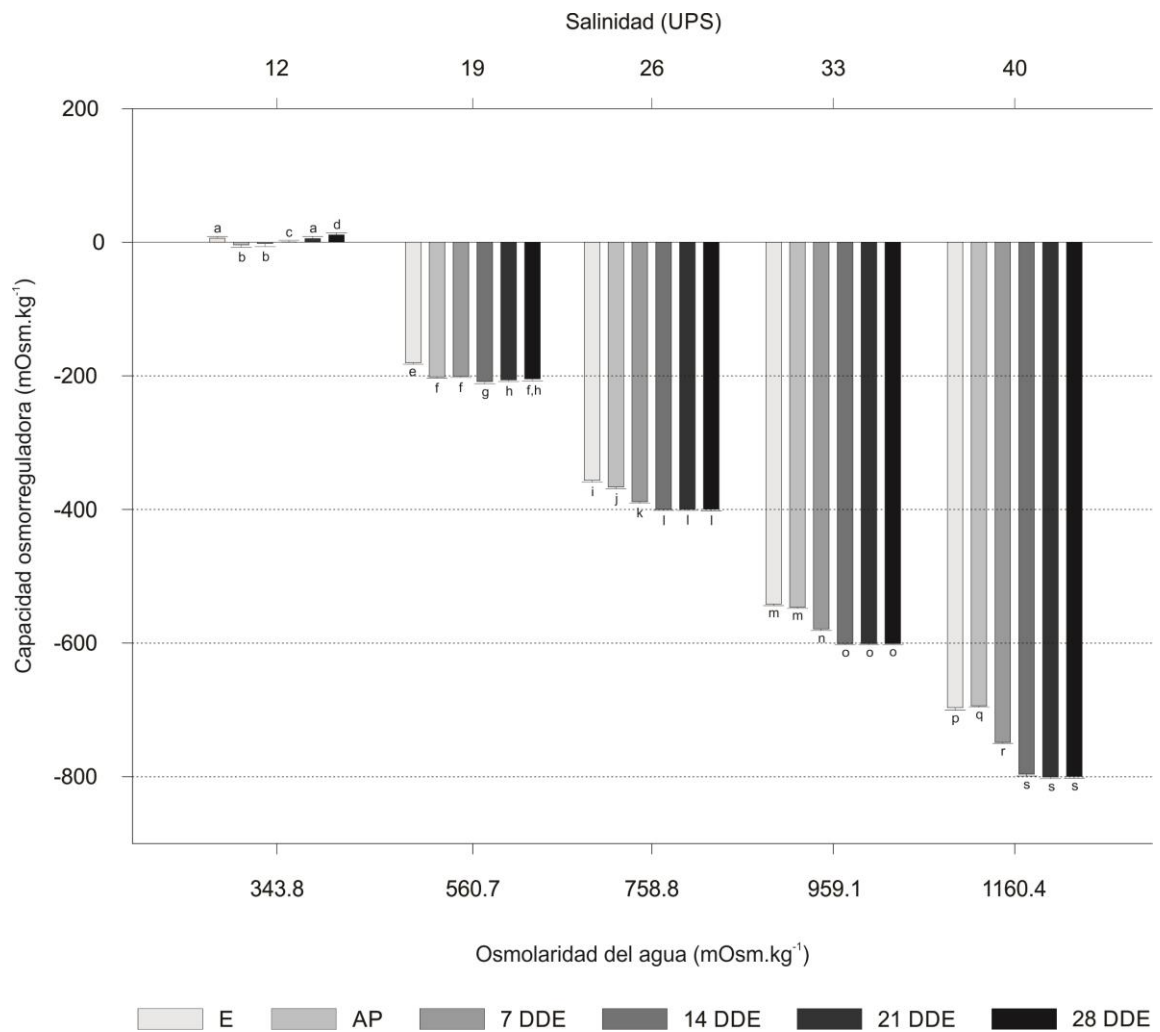


Figura 23. Capacidad osmorreguladora de las larvas de *S. annulatus* en diferentes etapas de su desarrollo larvario. Los valores positivos indican un comportamiento de hiperosmorregulación y los valores negativos un comportamiento de hiposmorregulación. E; eclosión, AP; apertura de la boca, DDE; días después de la eclosión. Las letras diferentes indican las diferencias significativas encontradas ($P < 0.05$). N=446

En el segundo experimento se revisó el efecto de someter a las larvas en diferentes etapas de su desarrollo larvario a cambios bruscos de salinidad. En la Figura 24 se muestran los resultados de dicho efecto sobre la sobrevivencia. En el inciso a), se presenta el resultado de la sobrevivencia al someter de manera

directa a las salinidades de prueba a larvas recién eclosionadas. Las larvas al ser expuestas a la salinidad de 5 murieron de manera casi inmediata, y es evidente que no pudieron aclimatarse a este cambio repentino, sin embargo, a partir de la salinidad de 12 ups al cabo de 3 horas de haberlas sometido a esta salinidad, se obtuvo un porcentaje de sobrevivencia superior al 50%, y después de 8 horas dicha sobrevivencia fue disminuyendo hasta que en la hora 40 fue del 0%, pero a partir de la salinidad de 19 ups las larvas presentaron una mayor tolerancia y capacidad de aclimatación, ya que de una sobrevivencia inicial cercana al 90% solo disminuyó hasta el 85% al cabo de 72 horas. De igual modo, en las salinidades de 26, 33, y 35 ups la sobrevivencia no sufrió cambios importantes y permaneció cercana al 100% por lo que estas salinidades no ejercieron un efecto significativo ($P > 0.05$) en la sobrevivencia en las larvas recién eclosionadas, sin embargo, se encontró que la salinidad de 40 si afectó de manera negativa a la sobrevivencia, debido a que de una sobrevivencia inicial cercana al 90% a las 3 horas de haber sido sometidas, la sobrevivencia disminuyó hasta el 63% al cabo de 72 horas de haber comenzado el análisis.

En el inciso b) se muestra el comportamiento de la sobrevivencia de las larvas en la apertura de la boca, en esta etapa, las larvas adquirieron una mayor capacidad de respuesta a cambios bruscos de salinidad y esto se refleja en que la sobrevivencia se vio menos afectada que en la etapa anterior, se aprecia que las larvas al ser sometidas a una salinidad de 5 ups presentaron una sobrevivencia del 50% a las 3 horas de haber comenzado el estudio, posteriormente disminuyó al 25% a las 8 horas y a las 32 horas la sobrevivencia

fue del 0%, en la salinidad de 12 ups las larvas presentaron una sobrevivencia cercana al 90% durante todo el tiempo que duró el experimento, la sobrevivencia en las salinidades de 26, 33 y 35 ups no se vio afectada ya que permaneció cercana al 100% durante las 72 horas. La sobrevivencia en la salinidad de 40 ups disminuyó de un 93% a las 3 horas hasta un 80% al final del estudio (72 horas), y en este caso, dicha salinidad siguió ejerciendo un efecto significativo ($P < 0.05$) sobre la sobrevivencia al igual que la salinidad de 5 ups. En el inciso c), se muestra que las larvas a los 7 DDE aumentaron su capacidad de respuesta a los cambios bruscos de salinidad, ya que la sobrevivencia se mantuvo por arriba del 95% en casi todos los casos en el tiempo que duró el análisis, solo en la salinidad de 5 ups la sobrevivencia disminuyó de un 95% a un 92% sin embargo no fue significativo ($P > 0.05$), y en las demás salinidades, la sobrevivencia permaneció cercana al 100%. Finalmente en el inciso d), se muestra el comportamiento de la sobrevivencia de las larvas por efecto a cambios bruscos a las salinidades de prueba en las etapas de 14, 21 y 28 DDE, se aprecia que la sobrevivencia fue del 100% en todos los casos, por lo que la salinidad no afectó de manera significativa ($P > 0.05$) a la sobrevivencia en todas estas etapas, reflejando la gran capacidad que presentaron las larvas de *S. annulatus* para aclimatarse a cambios repentinos de salinidad ($P > 0.05$).

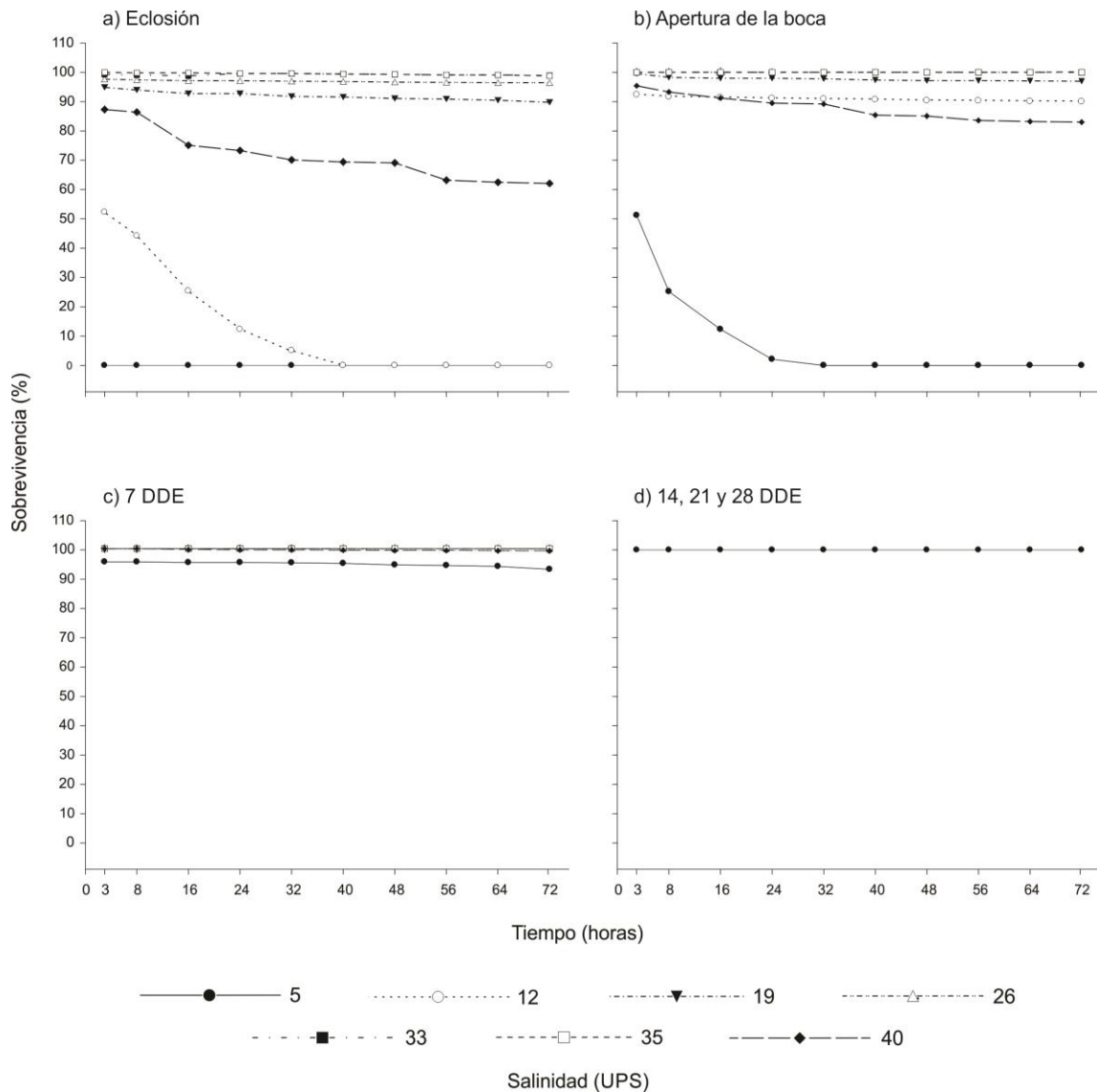


Figura 24. Porcentajes de sobrevivencia de las larvas en diferentes estadios de su desarrollo larvario en cambios bruscos de salinidad. DDE; días después de la eclosión. Las larvas de 14, 21 y 28 DDE presentaron una supervivencia del 100 %. N=5585.

El comportamiento de osmorregulación de las larvas al ser sometidas a cambios repentinos de salinidad se presentan en la Figura 25, se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el valor de los puntos isosmóticos encontrados en cada una de las etapas entre las horas estudiadas. Para las larvas recién

eclosionadas; los puntos isosmóticos variaron de 313.5 mOsm.kg⁻¹ en la hora tres a 456.2 mOsm.kg⁻¹ en la hora 72, para las larvas en la apertura de la boca; 319.1 mOsm.kg⁻¹ en la hora tres a 466.7 mOsm.kg⁻¹ en la hora 72, posteriormente para las larvas a los 7 DDE sus puntos isosmóticos oscilaron de 319.2 a 413.7 mOsm.kg⁻¹, a los 14 DDE se presentaron valores de 256.5 mOsm.kg⁻¹ en la tercer hora a 359.6 mOsm.kg⁻¹ en la hora 72, a los 21 DDE los valores fueron de 264.5 a 358.9 mOsm.kg⁻¹ de la hora 3 a la hora 72, y finalmente, las larvas a los 28 DDE sus puntos isosmóticos variaron de 274.3 a 358.8 mOsm.kg⁻¹ de la hora tres a la hora 72. En el inciso a) de la Figura 25, se observa que las presiones osmóticas más bajas se presentaron en la salinidad de 5 ups, sin embargo, las larvas no lograron sobrevivir después de tres horas en esta salinidad. En este caso, las PO se incrementaron con forme fue aumentando la salinidad y el tiempo, las PO más altas se encontraron en la salinidad de 40 ups (456.5 a 488.6 mOsm.kg⁻¹). En cada salinidad, las PO y los puntos isosmóticos aumentaron paulatinamente con el paso del tiempo, lo que reflejó una gran capacidad de aclimatación de las larvas recién eclosionadas, además, se aprecia que a partir de las 8 horas dichas PO aumentaron considerablemente. En el caso de la salinidad 35 ups las PO permanecieron sin diferencias significativas en cada salinidad. En el inciso b), se muestra el comportamiento osmorregulador de las larvas en el momento en el que abrieron la boca, hubo un ligero aumento de las PO con respecto a la etapa anterior, sin embargo no se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$), de igual forma las PO más bajas se encontraron también en la salinidad de 5 ups (263.86 a 302.84 mOsm.kg⁻¹ de la hora 3 a las 24 horas

respectivamente), las larvas murieron al cabo de 24 horas de haber sido sometidas a esta salinidad. De igual manera, las PO y los puntos osmóticos aumentaron en cada salinidad con el paso del tiempo hasta las 72 horas. Para los incisos c); 7 DDE, d); 14 DDE, e); 21 DDE y f) 28 DDE se encontró un comportamiento similar, y se muestra en las tablas II y III que los valores de las PO más bajos siempre se encontraron en la salinidad de 5 ups y con forme pasó el tiempo dichos valores aumentaron considerablemente, los puntos isosmóticos en cada caso aumentaron de la hora inicial a la hora final, también los valores mayores de las PO encontraron en las salinidades más altas, sin embargo, para la salinidad de 40 ups los valores iniciales de las PO fueron de mayor magnitud que los valores iniciales, esto también refleja la capacidad de osmorregulación de estos organismos, dicha capacidad se muestra en la Figura 26.

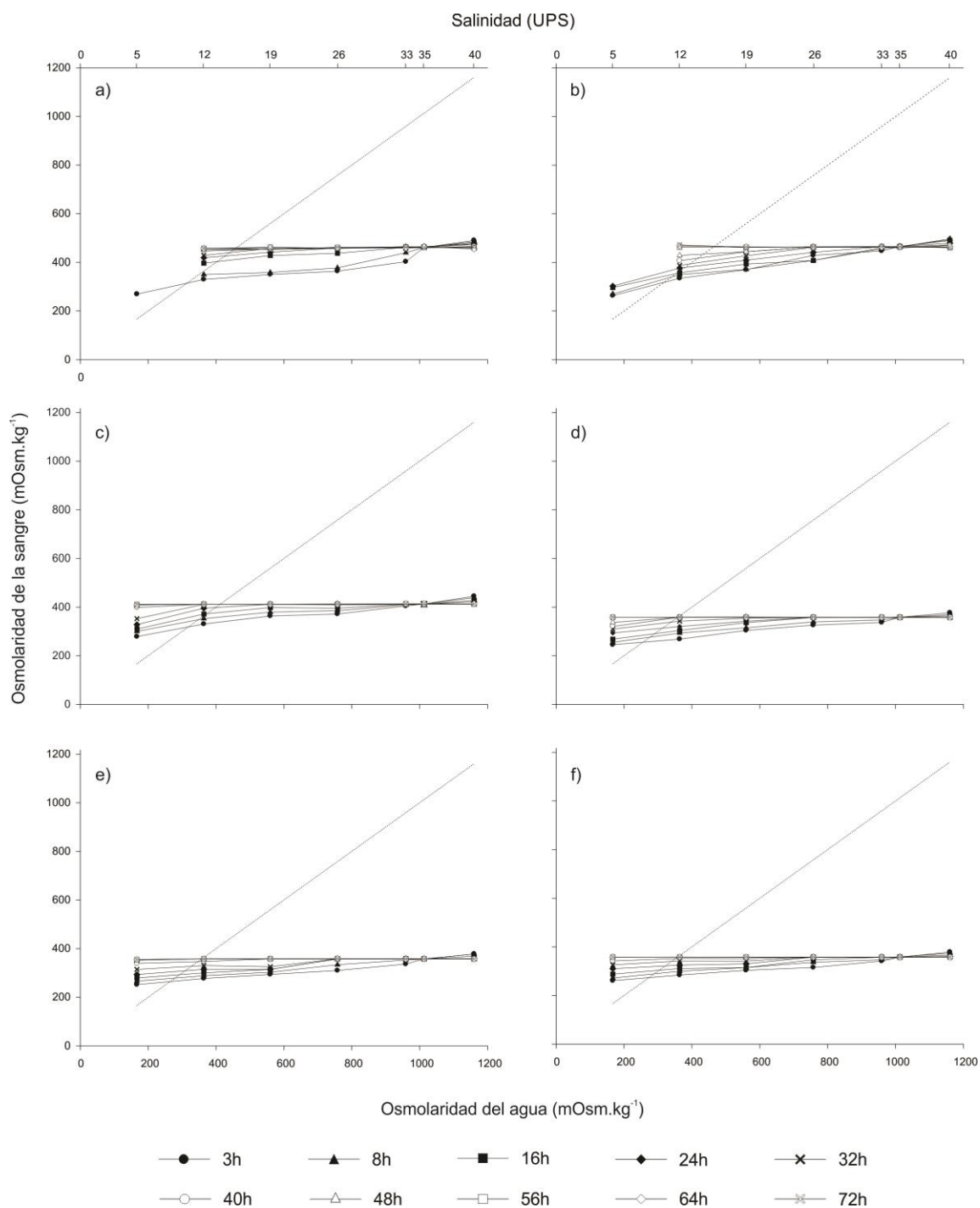


Figura 25. Comparación entre las presiones osmóticas de las larvas en diferentes estadios de su desarrollo con las presiones osmóticas del agua en las salinidades probadas durante las 72 horas en las que duró el experimento; a) eclosión, b) apertura de la boca, c) 7 días después de la eclosión (DDE), d) 14 DDE, e) 21 DDE y f) 28 DDE. La línea de 45° representa a la isosmolaridad.

La CO se vio afectada por la salinidad, aunque en la mayoría de los casos la CO presentó comportamientos similares (Figura 26). En el inciso a), se aprecian las CO de las larvas recién eclosionadas, para la salinidad de 5 sólo se obtuvieron resultados en la hora inicial (hora 3), ya que para la octava hora todos los organismos ya habían muerto, en este caso la CO fue de hiperosmorregulación al igual que en la salinidad de 12 ups, y a partir de la salinidad de 19 ups las larvas presentaron un comportamiento de hiposmorregulación, lo que indicó que las PO de la sangre de los organismos fue más baja que la del agua de mar, y con forme fue aumentando la salinidad esta diferencia fue mayor, lo que indica que los organismos pudieron mantener su medio interno estable independientemente de la salinidad. Posteriormente, en el inciso b) se muestran las CO de las larvas al abrir la boca, se aprecia que en la salinidad de 5 ups las larvas lograron sobrevivir hasta 24 horas y después de este tiempo las larvas murieron, y el comportamiento de las larvas fue de hiperosmorregulación en salinidades bajas (5 y 12 ups), de igual manera, a partir de la salinidad de 19 ups el comportamiento cambió a hiposmorregulación, sin embargo, en las primeras horas las CO presentaron mayor magnitud en la mayoría de los casos y se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) y conforme aumentó la salinidad las CO fueron de mayor magnitud. En el inciso c), cuando las larvas tenían 7 DDE presentaron mayor capacidad de osmorregulación, ya que las larvas en la salinidad de 5 ups lograron sobrevivir por todo el tiempo que duró el estudio y el valor absoluto de las CO aumentó hasta rebasar los 200 mOm.kg^{-1} después de las 48 horas, al igual que las etapas anteriores; el comportamiento de

osmorregulación fue de hiperosmorregulación en la salinidades de 5 y 12 ups, y a partir de la salinidad de 19 el comportamiento cambió a hiposmorregulación, también conforme fue aumentando la salinidad los valores absolutos de las CO aumentaron. A partir de los incisos d); 14 DDE, e); 21 DDE y f); 28 DDE las CO cambiaron a partir de la salinidad de 12 ups, se aprecia que solo en la salinidad de 5 ups se presentó un comportamiento de hiperosmorregulación por lo que a partir de la salinidad de 12 el comportamiento cambió a hiposmorregulación y por ende, las larvas aumentaron su capacidad para responder a cambios repentinos de salinidad y mantener su medio interno estable, también se encontraron menores casos de diferencias significativas entre las horas en las que se midió la CO, por lo que su comportamiento osmorregulador fue más estable que en las etapas anteriores.

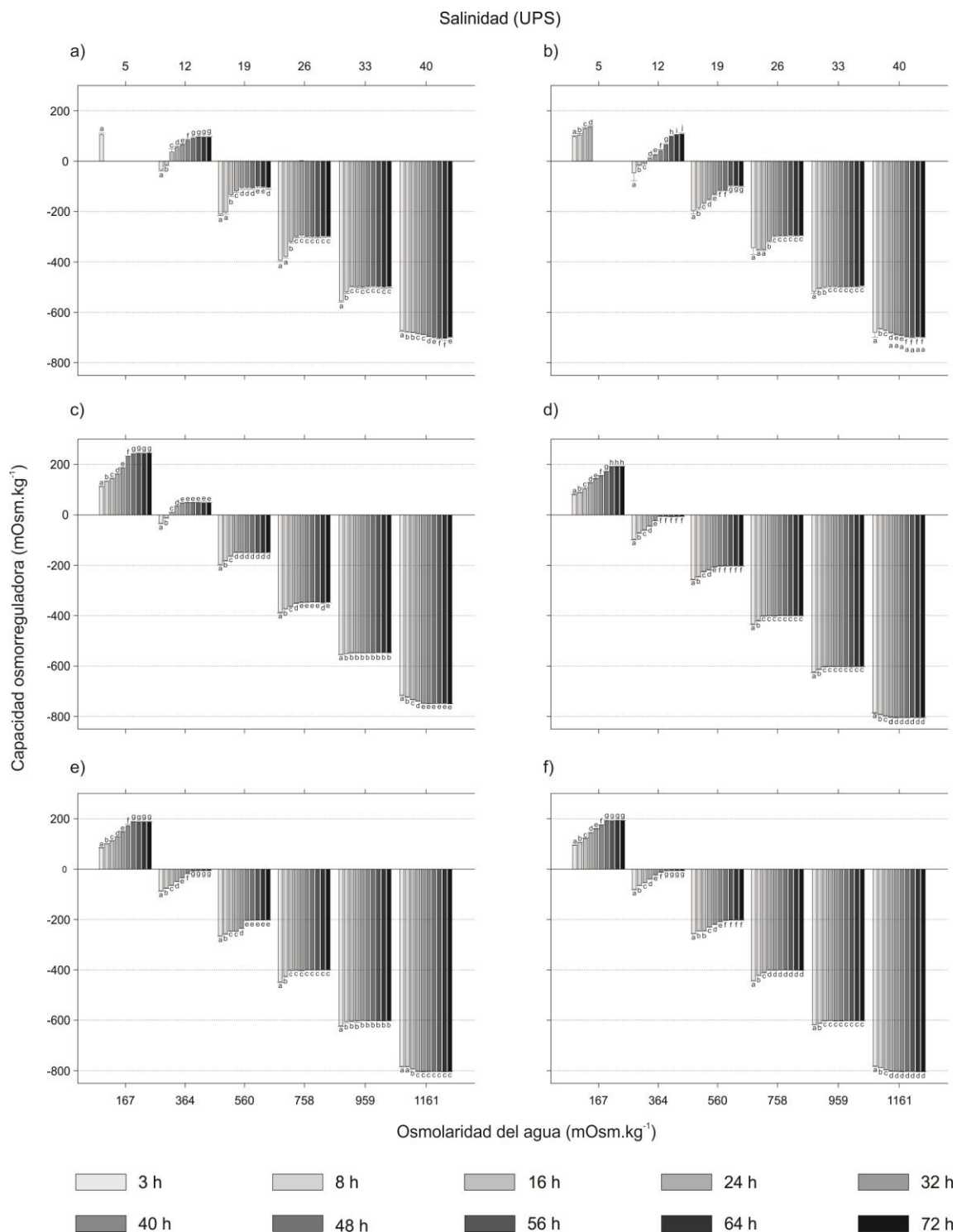


Figura 26. Capacidad osmorreguladora de larvas de *S. annulatus* en diferentes etapas de su desarrollo sometidas a cambios repentinos de salinidad en las 72 horas que duró el experimento. a) eclosión, b) apertura de la boca, c) 7 días después de la eclosión (DDE), d) 14 DDE, e) 21 DDE y f) 28 DDE. Los valores positivos indican un comportamiento de hiperosmorregulación y los

valores negativos un comportamiento de hiposmorregulación. Las letras diferentes indican las diferencias significativas encontradas ($P < 0.05$).

Finalmente, se encontró que las larvas que crecieron en la salinidad control a 35 ups en el experimento A crecieron de manera diferente a las larvas mantenidas en una salinidad a 35 ups y que fueron utilizadas para revisar el efecto de cambios bruscos de salinidad en diferentes etapas de desarrollo (experimento B), en ambos casos se utilizaron diferentes protocolos de alimentación y dicho crecimiento se observa en la Figura 27.

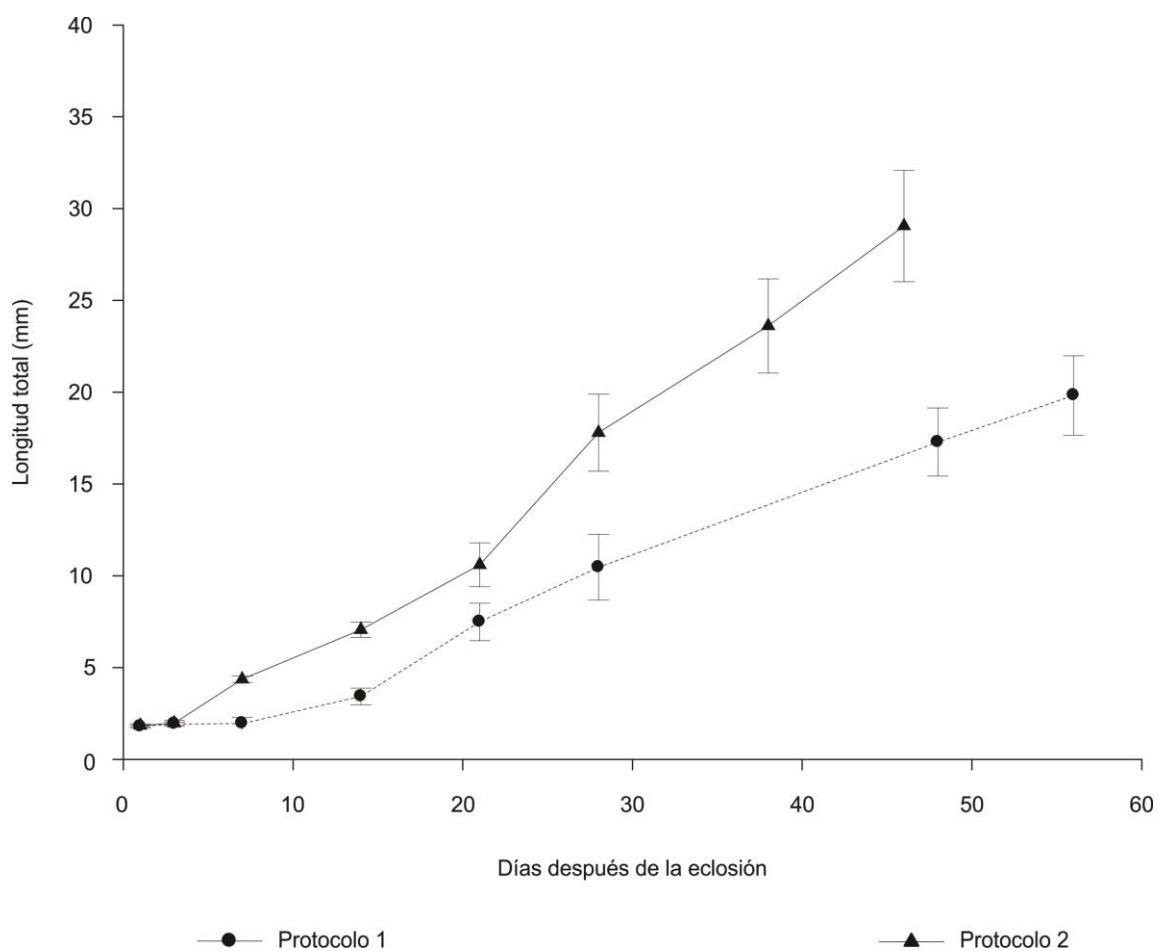


Figura 27. Crecimiento de las larvas post-eclosión a 35 ups en los dos experimentos realizados en este estudio. Protocolo 1; experimento A, protocolo 2; experimento B.

DISCUSIONES

Se han realizado trabajos previos en donde se ha revisado el efecto de diferentes salinidades sobre algunos aspectos de la fisiología de la osmorregulación en el botete diana (Pérez-Robles et al, 2012; Abdo-de la Parra et al, 2012). En el estudio hecho por Pérez-Robles et al, (2012) (ANEXO I) se encontró que los juveniles poseen gran capacidad para aclimatarse tanto en salinidades bajas como en altas, se consideró que el botete diana puede responder a estos cambios gracias a diferentes adaptaciones fisiológicas como las variaciones en la expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ la cual se vio influenciada por la salinidad y de acuerdo con Laverty y Skadhauge, (2012) ésta cualidad es de las principales adaptaciones en los procesos de osmorregulación de los teleósteos, además, se encontró que el botete diana puede utilizar diferentes sustratos como carbohidratos y proteínas para obtener la energía necesaria e invertirla en los procesos de osmorregulación, sin embargo, en dicho trabajo no se evaluó el efecto de la salinidad sobre el crecimiento y sobrevivencia, datos necesarios para establecer mejores estrategias de cultivo. Abdo-de la Parra et al, (2012) hicieron un análisis sobre el efecto de la salinidad y la temperatura sobre la incubación de los huevos del botete diana, ellos encontraron que la salinidad afectó de manera significativa el desarrollo embrionario y la eclosión, los mayores porcentajes de eclosión se encontraron en salinidades de 15 a 40 ups, los organismos no lograron eclosionar en salinidades de 50 ups en adelante, por otro lado no se le

dio seguimiento al estudio para revisar el efecto de la salinidad sobre el desarrollo larvario hasta la etapa de juvenil.

La ontogenia es un proceso que puede ser gradual o no, en este transcurso ocurren cambios morfológicos, anatómicos, fisiológicos, y de comportamiento (Varsamos et al, 2005; Koumoundouros et al, 2009; Brauner y Rombough, 2012). Tomando en cuenta lo anterior, se espera que durante del desarrollo larvario del botete diana los organismos respondan de manera diferente, es decir, que pueda haber diferencias significativas en la sobrevivencia, osmorregulación, y capacidad osmorreguladora por efecto de la salinidad en cada una de las etapas del desarrollo que se analizaron.

En el primer experimento realizado en este estudio, se encontró que efectivamente los organismos respondieron de manera diferente hacia estas variables, las cuales, fueron afectadas de manera significativa por la salinidad ($P < 0.05$). Se han realizado estudios similares en otras especies de teleósteos eurihalinos como el realizado por Bodinier et al, (2010b) en *Sparus auratta*, y al igual que *S. annulatus*, *S. auratta* migra hacia los estuarios para desovar. En este estudio se utilizó agua dulce (8 mOsm.kg^{-1}) y agua con mayor osmolaridad a $1327 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ (45.1 ups) a una temperatura constante de 18°C . Encontraron que la tasa de sobrevivencia se fue de entre 5.1 a 39.1% en las larvas de 3 DDE, y de 1.0 a 45.1% en larvas de 75 DDE, sin embargo, en dicho estudio las larvas fueron aclimatadas una vez alcanzaron el estadio de desarrollo en cuestión, es decir, en contraste con el trabajo que hicimos, las larvas no se desarrollaron en

las salinidades de prueba desde su eclosión, es por esta razón que en el trabajo aquí presentado, la sobrevivencia disminuyó desde 90% hasta menos del 5% después de los 28 DDE por lo que la sobrevivencia pudo ser afectada por otros factores externos como la alimentación, el manejo de los organismos, el lugar en donde se ubicaron las unidades experimentales, estrés, etc. Zhang et al, (2010) hicieron un estudio con el pez globo asiático *Takifugu flavidus* de la misma familia que *S. annulatus*, en parte de dicho estudio, revisaron el efecto de la salinidad (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 y 45 ups) sobre el desarrollo larvario desde el día 3 al día 23 DDE, encontraron que la tasa de sobrevivencia fue superior al 75% en larvas de 1 DDE sometidas a salinidades de 10 a 40, para esta especie se encontró que en salinidades de 10 a 20 ups las larvas se desarrollan de mejor manera hasta los 3 DDE, además, presentaron menor mortalidad. Posteriormente, encontraron que hasta el día 23 DDE las larvas se desarrollaron mejor en un rango de salinidades de 15 a 35 ups, sin embargo, obtuvieron que en las salinidades de 15 a 25 ups los organismos alcanzaron las tasas de crecimiento más altas. En todos los casos, los organismos no toleraron salinidades superiores a 45 ups.

En contraste con *S. annulatus*, *Takifugu flavidus* tiene problemas para desarrollarse en salinidades altas (> a 35 ups), y revisando este estudio y estudios previos se ha determinado que el botete diana puede soportar salinidades desde 12 a 40 ups (Pérez-Robles et al, 2012; Abdo-de la Parra et al, 2012). Sin embargo, con respecto al crecimiento, en el primer experimento de

este estudio no se observó un efecto directo de la salinidad sobre el crecimiento en cada etapa analizada, pero después de los 14 DDE los organismos aumentaron de tamaño considerablemente en todas las salinidades, no obstante, como se muestra en la Figura 19 es evidente que el crecimiento puede estar sujeto a otros factores, por ejemplo la alimentación y el trato que se les dio a los organismos, ya que para el primer experimento, las larvas fueron alimentadas siguiendo un protocolo distinto (protocolo 1) al utilizado para las larvas que se sometieron a cambios bruscos de salinidad en el segundo experimento (protocolo 2) (Figura 27), aunque para hacer esta comparación en ambos casos se utilizaron organismos que se desarrollaron a una salinidad constante de 35 ups, sin embargo, las larvas utilizadas en el segundo experimento crecieron en un tanque de mayor volumen (ver métodos), por lo que estos organismos crecieron más de 25 mm a los 48 DDE, y las larvas utilizadas en el primer experimento solo crecieron hasta casi 20 mm de longitud a los 58 DDE, cabe señalar que en ambos protocolos las larvas se cultivaron a la misma temperatura de 28 ± 1.5 , ya que es necesario considerar que la temperatura es muy importante y afecta de manera directa al crecimiento, en este caso se utilizó una temperatura muy cercana a la recomendada por Reyes et al, (2011). Con respecto a esto, en un estudio realizado por Shi et al, (2010) en *Takifugu obscurus* se observó que tanto la salinidad como la temperatura fueron variables que afectaron considerablemente el crecimiento, encontraron que las tasas específicas de crecimiento incrementaron al incrementar la temperatura de 20 a 29 °C y a una salinidad alta de 25 ups tanto el crecimiento y sobrevivencia disminuyeron, las tasas de

crecimiento más altas ocurrieron en salinidades bajas de 8 a 10 ups y las tasas de sobrevivencia más altas (> 90%) se presentaron en un rango de salinidades de 0 a 20 ups, y concluyeron que para *T. obscurus* el rango óptimo de salinidad para la larvicultura es 8 a 10 ups y de 0 a 20 ups, respectivamente, por lo que esta especie puede ser cultivadas en zonas costeras en donde el promedio de salinidad este en dichos rangos. Aunque *T. flavidus* y *T. obscurus* pertenecen a la misma familia que *S. annulatus*, con respecto al crecimiento se puede inferir que el botete diana puede ser cultivado en un rango de salinidades más amplio que puede ser de la salinidad de 12 a 40 ups.

La osmorregulación en juveniles de *S. annulatus* fue revisada por Pérez-Robles et al, (2012) y encontraron que su comportamiento osmorregulador fue hiposmótico en salinidades de 23 a 41 ups e hiperosmótico en 10 ups, y se determinó el punto isosmótico en 356 mOsm.kg⁻¹ que correspondió en la salinidad de 10 ups. En el estudio aquí presentado, se logró determinar un comportamiento osmorregulador similar, y aunque se tratasen de diferentes etapas del desarrollo, los puntos isosmóticos encontrados en cada una de ellas fue muy cercano (338.9 a 355.9 mOsm.g⁻¹), aunque para los organismos desarrollados en una salinidad de 5 el promedio de las PO fue más bajo, además, estas larvas en diferentes etapas de su desarrollo ya presentan el mismo comportamiento osmorregulador que los juveniles, y con forme aumento la edad desde la eclosión hasta los 28 DDE dicho comportamiento fue más estable y las pendientes de las rectas disminuyeron y se acercaron más al valor de 0, lo que

según Marshall y Grosell, (2006) entre más cercana sea la pendiente a 0, las presiones osmóticas de la sangre permanecerán más estables. Para las larvas de *S. annulatus* en diferentes etapas del desarrollo, se encontró una capacidad de osmorregulación similar a los juveniles; en salinidades bajas (12 ups) se encontró un comportamiento de hiperosmorregulación, y a partir de la salinidad de 19 ups cambio el comportamiento a hiposmorregulación en todas las etapas del desarrollo, sin embargo se encontraron diferencias significativas en algunas etapas, además, la CO de las larvas fue muy similar a lo encontrado por Pérez-Robles et al, (2012) en términos absolutos, lo que indicó que las larvas desde sus primeras etapas de desarrollo adquirieron las habilidades de osmorregulación necesarias, y que como se demostró en juveniles previamente, esto puede estar asociado a adaptaciones importantes como la capacidad de aumentar o disminuir la expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ . En *Dicetrarchus labrax* se observó un comportamiento similar, en donde a bajas salinidades 5.1 y 9.9 ups los organismos híper-osmorregularon y a salinidades de 17.2 a 39.5 ups hiposmorregularon considerando también diferentes estadios del desarrollo larvario y en todos los casos se encontró este mismo comportamiento (Varsamos et al, 2001). En otras especies de teleósteos eurihalinos se ha encontrado respuestas similares, y al variar la salinidad pueden mantener la PO de su medio interno estable, y en la mayoría de los casos la CO se vuelve más negativa al aumentar la salinidad y más positiva al disminuirla, esto siempre ha estado asociado a los niveles de expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ , aunque no es la única enzima asociada a los procesos de osmorregulación celular, en otros trabajos se ha

analizado la importancia de otras proteínas como lo son los canales de Cl^- , de Na^+ , el co-transportador NKCC, y la importancia de las acuaporinas, todos estos factores están directamente asociados a los procesos de osmorregulación de los peces desde sus primeras etapas de vida (Tipsmark et al, 2002; Lin et al, 2004a; Hiroi et al, 2005; Kang et al, 2010; Giffard-Mena et al, 2011; Lorin-Nebel et al, 2006).

En el segundo experimento, la sobrevivencia se vio influenciada por los cambios repentinos de salinidad y se encontraron diferencias significativas entre cada una de las etapas ($P > 0.05$) (Figura 20). En la etapa de eclosión, las larvas no sobrevivieron en la salinidad de 5 ups, posteriormente aumentó su sobrevivencia, demostrando que; a tempranas etapas del desarrollo, esta especie incrementó su capacidad para soportar cambios repentinos de salinidad, sin embargo en la salinidad de 12 ups, la sobrevivencia disminuyó al 0% en la hora 40. Otras especies muestran un comportamiento similar, sin embargo, la respuesta a estos cambios abruptos de salinidad está influenciada por su procedencia o hábitat de cada especie, es decir, en algunos casos, como en la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) al ser una especie de origen dulce acuícola se ha observado que soporta cambios abruptos hacia las salinidades bajas (12.5 a 20 ups) y esto fue demostrado en un estudio realizado por Fridman et al, (2012b), además en dicho trabajo se encontró que a mayor edad las larvas pueden soportar mejor los cambios repentinos de salinidad hacia las salinidades más altas (17.5 a 20 ups), ya que su sobrevivencia aumentó de un 83% en el momento

de la eclosión a un 99% a los 8 DDE. En el caso de *S. annulatus* se aprecia que a los 2 DDE en el momento que las larvas abrieron la boca, la sobrevivencia aumentó considerablemente con respecto a la etapa anterior, debido a que los organismos transferidos a la salinidad de 5 soportaron más tiempo y lograron sobrevivir hasta 24 horas en dicha salinidad, aunque cuando fueron transferidos a dicha salinidad, inmediatamente murió aproximadamente el 50% de las larvas, en cambio, en la salinidad de 12 los organismos presentaron una sobrevivencia superior al 90% lo que reflejó que a partir de esta etapa las larvas pueden soportar un cambio repentino hacia las bajas salinidades, sin embargo, en las larvas sometidas a la salinidad de 40 ups la sobrevivencia disminuyó de un 93% a un 80% por lo que a mayores salinidades la sobrevivencia puede ser afectada, y al igual que *O. niloticus* al abrir la boca la capacidad para soportar cambios abruptos de salinidad aumenta considerablemente. Para las larvas de *S. annulatus*, a partir del 7 DDE la sobrevivencia en todas las salinidades estudiadas está por arriba del 90 %, en esta etapa, prácticamente las larvas han adquirido mayor capacidad para soportar cambios abruptos de salinidad, y en este caso, la sobrevivencia más baja se presentó en las en los organismos transferidos a la salinidad de 5 ups la cual fluctuó del 95% al 93%, sin embargo no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$), de igual manera a partir del 14 DDE hasta el 28 DDE la sobrevivencia por efecto de los cambios repentinos de salinidad no se vio afectada, es decir, no hubo una disminución en el porcentaje de sobrevivencia desde que los organismos fueron transferidos a las salinidades de prueba hasta que se terminó el experimento a las 72 horas después, dicha sobrevivencia

permaneció en el 100%, en este punto, las larvas no se ven afectadas por los cambios bruscos de salinidad, y esto se refleja en su comportamiento osmorregulador y en su capacidad osmorreguladora.

En la Figura 21, se muestran los cambios graduales en el comportamiento osmorregulador del botete diana en diferentes etapas de su desarrollo larvario, aunque se observaron cambios más marcados en las pendientes de osmorregulación en las primeras horas de exposición (3 y 8 h), este comportamiento fue más evidente en las primeras etapas del desarrollo (eclosión y apertura de la boca), sin embargo, en la mayoría de los casos, las pendientes fueron muy cercanas a 0, lo que indicó que esta especie posee una gran capacidad para evitar fluctuaciones en las PO de la sangre por efecto de cambios bruscos de salinidad, y conforme fueron desarrollándose esta capacidad aumento de tal modo que el valor de las pendientes cada vez se acercó más al valor de 0, de igual forma, los puntos isosmóticos se vieron afectados por el tiempo y la salinidad en cuestión. Este resultado coincide con lo obtenido en juveniles por Pérez-Robles et al, (2012) y lo encontrado en el primer experimento de este estudio, sin embargo, es evidente que en las primeras etapas de desarrollo las larvas se vieron con más problemas para osmorregular, ya que como se ha señalado anteriormente, los organismos recién eclosionadas al ser sometidos a bajas salinidades disminuyeron su sobrevivencia, y presentaron Pos muy bajas. Sin embargo, existe una diferencia importante entre las larvas que crecieron en las salinidades de prueba en el primer experimento, con las larvas

que se desarrollaron en agua de mar (salinidad de 35 ups) y que, al ser sometidas a cambios bruscos de salinidad, tuvieron que responder de manera instantánea a dicha circunstancia, esto puede demandar una cantidad de energía importante, además puede ser un factor de estrés, por lo que sería importante poder medir el consumo de oxígeno, excreción nitrogenada y poder relacionar estas variables con el nivel de estrés, y verificar que sustrato entre carbohidratos, proteínas y lípidos, pueden ser utilizados para obtener energía de manera inmediata, esto es algo que Pérez-Robles et al, (2012) estudiaron en los juveniles, y encontraron que tanto las proteínas como lípidos son usados para este fin, y en este caso, se puede inferir que estas condiciones provocaron la muerte de las larvas en sus primeras etapas de desarrollo ya que fisiológicamente hablando, no contaron con lo necesario para poder osmorregular y responder a dichas condiciones, condiciones, que con la edad fueron superadas.

En el estudio realizado por Bodinier et al, (2010b) sobre la osmorregulación en diferentes etapas del desarrollo de *S. auratta*, las larvas fueron mantenidas a una salinidad de 25.5 ups y se sometieron a cambios repentinos de salinidad; a 5.1 y 45.1 ups, y se observó fluctuaciones en los niveles de las PO y dependió de la edad de las larvas, para las larvas de 30 DDE las PO fluctuaron alrededor de los 250 mOsm.kg⁻¹ al ser sometidas a 5.1 ups y de 300 mOsm.kg⁻¹ cuando se transfirieron a 45.1 ups, para las larvas de 88 DDE la PO oscilaron de 350 a 400 mOsm.kg⁻¹ al ser colocadas a las salinidades de 5.1 y 45.1 ups respectivamente, y en este caso, las PO se estabilizaron después de las 10 horas de que las larvas

fueron expuestas a las salinidades de prueba. Sin embargo, las larvas de *S. annulatus* no poseen tanta capacidad de soportar cambios repentinos hacia las salinidades bajas en las primeras etapas del desarrollo, ya que las PO permanecieron más fluctuantes, no obstante, después de las 8 horas de que las larvas fueron transferidas a las salinidades de prueba, pudieron incrementar su capacidad para mantener su medio interno más estable, en contraste con *S. auratta*, que en sus primeras etapas de desarrollo de los 3 a 75 DDE presentaron un comportamiento más apegado a la osmoconformación (pendiente más cercana al valor de 1), por lo que los cambios repentinos de salinidad afectaron más a las larvas de esta especie.

Kato et al, (2005) realizaron un estudio comparativo sobre la osmorregulación y otros aspectos en distintas especies de la familia *Tetraodontidae*; *Takifugu obscurus*, *T. pardalis*, *T. nophobles*, *T. rubripres*, *T. poecilonotus* y *T. porphyreus*, en parte de este análisis sometieron a organismos adultos de dichas especies a cambios repentinos de salinidad; los organismos fueron mantenidos en agua de mar y posteriormente se transfirieron de manera directa a agua salobre y agua dulce, encontraron que estas especies respondieron de manera diferente tomando en cuenta su sobrevivencia y sus PO. Descubrieron que cuando los organismos fueron transferidos de manera abrupta al agua dulce y agua salobre *T. obscurus* demostró soportar mejor dichos cambios ya que su sobrevivencia permaneció en el 100% en los 10 días que duró el experimento, manteniendo su PO en $346 \pm 5.7 \text{ mOsm.kg}^{-1}$, la segunda especie en soportar dichos cambios fue

T. pardalis, la cual pudo mantener su tasa de supervivencia en un 100% en agua dulce al cuarto día, posteriormente comenzó a disminuir gradualmente hasta alcanzar una tasa de supervivencia menor al 10% después del octavo día de exposición, otras especies; *T. nophobles* y *T. rubripres* presentaron un comportamiento muy similar al ser transferidas a agua dulce, sin embargo, *T. poecilonotus* y *T. porphyreus* no sobrevivieron al segundo día. En agua salobre, la mayoría de las especies mantuvieron su tasa de supervivencia por arriba del 90% en los 10 días de exposición, excepto *T. nophobles* y *T. rubripres* cuya supervivencia disminuyó hasta el 80% al octavo día de análisis. En base a esto, los autores concluyeron que *T. obscurus* posee mejor capacidad para adaptarse a salinidades bajas. También en otro estudio realizado en *T. rubripes* por Lee et al, (2005) se corroboró que posee gran capacidad para sobrevivir a bajas salinidades (hasta un 25% de agua de mar), encontraron que cuando los organismos se sometieron a cambios repentinos de salinidad, la osmolaridad permaneció sin cambios significativos alrededor de los 300 mOsm.kg⁻¹. Comparando estos resultados con lo encontrado para juveniles de *S. annulatus* en el presente trabajo, se puede inferir que al igual que *T. obscurus* y *T. rubripes* el botete diana posee las mismas capacidades de aclimatación a salinidades bajas, las cuáles son superiores a otras especies de peces globo.

La CO encontrada para las larvas del botete diana en cambios bruscos de salinidad se muestra en la Figura 23, se aprecia un comportamiento muy similar en cada una de las etapas analizadas, y fue similar a lo encontrado en el primer

experimento, en donde las larvas crecieron en cada una de las salinidades de prueba, no obstante, en el primer experimento se observa que en la salinidad de 12 las larvas se encontraron muy cerca de su punto isosmótico, ya que dicha CO no presentó valores muy altos hacia la hiperosmorregulación, en cambio, en el segundo experimento se obtuvo que en las etapas de eclosión, apertura de la boca y 7 DDE, las larvas hiperosmorregularon en las salinidades de 5 y 12, fue hasta la etapa de 14 DDE que a partir de la salinidad de 12 ups las larvas hiposmorregularon, además, al igual que otras especies como *D. labrax* y *S. auratta* la CO dependió del comportamiento osmorregulador, es decir, en dichas especies eurihalinas que tienen la capacidad de mantener la osmolaridad de su medio interno en un rango fisiológico óptimo, la CO va a aumentar en valores positivos cuando el agua o medio externo este mas diluido que la sangre de los organismos, por lo contrario, la CO va a aumentar en términos negativos cuando el medio externo esté más concentrado que el medio interno de los peces (Varsamos et al, 2001; Bodinier et al, 2010a)

En diferentes etapas del desarrollo larvario del botete diana es importante revisar el nivel de expresión de proteínas especializadas en la osmorregulación como la ATPasa de Na^+/K^+ , y analizar la relación de dicha expresión con la CO y sobrevivencia, además, revisar *in situ* la localización enzimática en branquias y otros órganos, como la piel y el intestino, con esta información, se podrá comprender de mejor manera que ocurre con las principales células de la osmorregulación (células MR), y dar un seguimiento a los cambios que van

ocurriendo en la ontogenia de esta especie, que si bien, no presenta una metamorfosis como tal, si ocurren cambios importantes en su morfología, velocidad de crecimiento y de comportamiento, y en este caso, los procesos de osmorregulación pueden influir en su crecimiento ya que todas las células invierten energía a dicha tarea, energía que puede ser aprovechada para crecer y desarrollarse.

En general, la mayoría de los estudios sobre la fisiología de la osmorregulación en peces globo se ha enfocado en especies de potencial comercial, las cuales siempre se ven afectadas por cambios de salinidad que ocurren en su medio, desde un punto de vista ecológico; las adaptaciones fisiológicas necesarias para afrontar estas condiciones ambientales les han permitido permanecer en diferentes ambientes en la zona costera y estuarina, en dichos hábitats se pueden desarrollar proyectos productivos enfocados a la crianza y reproducción para aprovechamiento sustentable. En el caso de *S. annulatus*, y en base a la información encontrada en todos los estudios realizados con la especie, se tiene suficiente información para implementar estrategias de cultivo de manera intensiva y semi-intensiva, sin embargo, aspectos relacionados con la nutrición y/o alimentación de los organismos en diferentes etapas del desarrollo es un tema que tiene que ser revisado de manera más profunda y examinar el costo-beneficio de esta variable en los cultivos, ya que al ser una especie de hábitos carnívoros y que requiere de un aporte importante de proteína, los costos de alimentación pueden ser muy elevados, no obstante, en este trabajo se hace una comparación

entre dos protocolos de alimentación (Figura 27) y se observa que el crecimiento de las larvas depende del volumen de cultivo, densidad, temperatura y de estrategias de alimentación, sin embargo, también es importante considerar la salud, edad y estado fisiológico de los reproductores.

Principales hallazgos

- Las larvas de botete diana que fueron aclimatadas gradualmente en las salinidades de prueba crecieron gradualmente en cada salinidad desde la eclosión hasta los 28 DDE, no se consideró que la salinidad afectara al crecimiento ya que no hubo consistencia en los resultados.
- EL PS se vio afectado por la salinidad ($P < 0.05$) en cada etapa estudiada; al momento de la eclosión, y a partir de la salinidad de 12 ups, el PS estuvo por arriba del 80%, sin embargo, disminuyó con el tiempo en cada salinidad y en cada etapa, de tal manera que a los 28 DDE, el PS estuvo alrededor del 3%.
- Los PI de las larvas mantenidas en salinidades constantes no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) y osciló de 338.9 a 355.9 mOsm.kg⁻¹.
- Las PO se vieron afectadas por la salinidad, y los valores más altos en todas las salinidades se encontraron en la etapa de eclosión (349.8 a 470.6 mOsm.kg⁻¹) y se estabilizaron a los 28 DDE (348.1 a 357.1 mOsm.kg⁻¹).
- En las salinidades constantes, las larvas en todas las etapas estudiadas hiper-osmorregularon en 12 ups e hipo-osmorregularon en salinidades a partir de 19 ups.
- Las larvas aclimatadas a 35 ups en diferentes estadios de su desarrollo larvario fueron sometidas bruscamente a diferentes salinidades, el PS se comportó de diferentes maneras; en la eclosión, las larvas no

sobrevivieron en 5 ups, en 12 ups, a las 40 horas el PS disminuyó a 0%. En 40 ups, el PS disminuyó de 87% hasta 60% a las 72 horas. Esto implicó que las larvas de botete diana no sobreviven a cambios bruscos de salinidad en salinidades menores a 19 ups, de igual forma en 40 ups pueden ser susceptibles.

- Cuando las larvas que abrieron la boca fueron sometidas bruscamente a diferentes salinidades, el PS disminuyó del 50% a 0% en la salinidad de 5 ups al cabo de 24 horas, sin embargo, en la salinidad de 12 ups el PS estuvo por arriba del 80%. En esta etapa las larvas siguen siendo vulnerables a cambios bruscos en salinidades menores a 5 ups.
- Las larvas sometidas a cambios bruscos de salinidad a los 7 DDE hasta los 28 DDE sobrevivieron satisfactoriamente, ya que el PS fue mayor al 95%. Esto implica que las larvas de botete pueden ser sometidas a salinidades bajas y altas sin afectar su supervivencia.
- En la etapa de eclosión, las larvas presentaron los mayores problemas para osmorregular en salinidades menores a 12 ups, ya que el comportamiento osmorregulador presento las pendientes más cercanas a la unidad, sin embargo, a partir del 7 DDE las PO se estabilizaron lo que reflejó en un aumento en la capacidad osmorreguladora. Desde el punto de vista osmorregulador, las larvas menores a 7 DDE no osmorregulan adecuadamente al ser sometidas de manera brusca en salinidades menores a 12 ups.

- Las larvas recién eclosionadas cuando se sometieron a la salinidad de 5 ups, no pudieron osmorregular y murieron, sin embargo, al abrir la boca, hiper-osmorregularon en 5 y 12 ups hasta las 8 horas, después de este tiempo los organismos murieron. A partir de los 7 DDE en todas las salinidades, las larvas hiper-osmorregularon en 5 y 12 ups e hipo-osmorregularon en salinidades de 19 a 40 ups. Posteriormente a los 14 DDE a los 28 DDE solo en 5 ups hiper-osmorregularon y a mayores a 12 ups hipo-osmorregularon. Esto implica que la capacidad osmorreguladora de las larvas se ve comprometida en las etapas tempranas (eclosión, apertura de la boca y a los 7 DDE) cuando son sometidas a cambios bruscos a salinidades bajas de 12 y 5 ups.
- Como información adicional, se encontró que la alimentación de las larvas bajo condiciones estables de salinidad y temperatura (35 ups y 28 °C) influyó significativamente en el crecimiento, demostrando que el protocolo de alimentación No. 2 fue más eficiente que el protocolo No. 1, debido a que en menor tiempo (48 días) alcanzaron tamaños promedio de 27 mm, mientras que las larvas alimentadas siguiendo el protocolo 1 en 55 días solo crecieron 18 mm en promedio.

CONCLUSIONES GENERALES

- Los juveniles aclimatados a las salinidades constantes respondieron de manera diferente que los que fueron sometidos a cambios graduales de salinidad. En el primer caso, las salinidades de prueba no afectaron significativamente ($P > 0.05$) a la TCO, TEA y la relación O:N, en cambio, los organismos sometidos a salinidades fluctuantes se vieron afectados por la salinidad, ya que su consumo de oxígeno y excreción nitrogenada se vieron influenciados por la salinidad, además, los organismos presentaron estrés por dichos cambios de salinidad. En ambos casos la salinidad afectó significativamente ($P < 0.05$) al nivel de expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ aumentando el nivel de expresión con forme aumento la salinidad, además, el menor nivel de expresión se observó en bajas salinidades cerca del punto isosmótico (356 mOsm.kg^{-1}) con un comportamiento en forma de “U”.
- Los patrones y capacidades de osmorregulación en los juveniles de botete diana mantenidos en salinidades constantes y sometidos a salinidades fluctuantes, indicaron que en esta etapa, *S. annulatus* es un organismo fuertemente osmorregulador capaz de mantenerse adecuadamente en bajas y altas salinidades, además, mantuvieron sus PO constantes dentro de sus intervalos fisiológicos óptimos, por lo tanto, exhibieron una pendiente de comportamiento osmorregulador cercana a cero, también, la

CO indicó un patrón de hipo-osmorregulación en la salinidad de 10 ups e hipo-osmorregularon en salinidades de 17 a 40 ups.

- Se encontró que durante el desarrollo embrionario, la salinidad afectó al PE, TE, PN y PD de embriones del botete diana. En salinidades inferiores a 12 ups, el PE disminuyó y en 5 ups fue de sólo 2.6%, sin embargo, los embriones antes de eclosionar presentaron una capacidad de osmorregulación significativa, ya que las PO permanecieron con variaciones no significativas independientemente de la salinidad y etapa del desarrollo en cuestión, también, las PO fueron mayores a la de los juveniles ($< 400 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ pero $> 500 \text{ mOsm.kg}^{-1}$). Los embriones hiper-osmorregularon en salinidades de 5 y 12 ups e hipo-osmorregularon de 19 ups hasta 40 ups, sin embargo, al momento de la eclosión, a 5 ups no osmorregularon. Para el TE, la salinidad hizo que a bajas salinidades ≤ 12 ups y a 40 ups las necesitaron más tiempo para eclosionar (más de 50 horas), a 35 ups se encontró el menor tiempo de eclosión el cual fue de 45.5 horas. Las larvas que lograron eclosionar en la salinidad de 5 ups murieron al cabo de 3 horas y el PD fue de 26.67% a partir de 12 ups no se observaron larvas deformes.
- Las larvas mantenidas en salinidades constantes desde la eclosión hasta la etapa de juvenil a los 28 DDE crecieron de manera uniforme y alcanzaron tamaños de 8 a 10 mm en todas las salinidades, sin embargo,

no fue posible comprobar que la salinidad ejerció un efecto importante sobre el crecimiento debido a que hubo inconsistencias en los resultados por posible sesgo por factores externos, como la ubicación de los tanques dentro del laboratorio, incidencia de luz en los tanques, capacidad de las larvas para atrapar el alimento vivo, etc. Las larvas no lograron sobrevivir en las salinidades de 5 ups, por lo que no fue posible hacer las mediciones de las variables objetivo en dicha salinidad. El PS disminuyó en las demás salinidades estudiadas (12 a 40 ups) de > 80% en la eclosión a 3.6% a los 28 DDE.

- Las larvas de diferentes estadios del desarrollo larvario aclimatadas a 35 ups, al ser sometidas a cambios repentinos de salinidad, no sobrevivieron al ser expuestas a 5 ups en la etapa de la eclosión, y en la salinidad de 12 ups disminuyó hasta 0% a las 40 horas. Las larvas se vieron susceptibles a las salinidades menores a 12 ups cuando son menores a los 7 DDE, posteriormente el PS se mantiene por arriba del 90%.
- En la etapa de eclosión, las larvas presentaron los mayores problemas para osmorregular en salinidades menores a 12 ups, ya que el comportamiento osmorregulador presento las pendientes más cercanas a la unidad, sin embargo, a partir del 7 DDE las PO se estabilizaron lo que reflejó en un aumento en la capacidad osmorreguladora. Desde el punto de vista osmorregulador, las larvas menores a 7 DDE no osmorregulan

adecuadamente al ser sometidas de manera brusca en salinidades menores a 12 ups. Las larvas recién eclosionadas cuando se sometieron a la salinidad de 5 ups, no pudieron osmorregular y murieron, sin embargo, al abrir la boca, hiper-osmorregularon en 5 y 12 ups hasta las 8 horas, después de este tiempo los organismos murieron. A partir de los 7 DDE en todas las salinidades, las larvas hiper-osmorregularon en 5 y 12 ups e hipo-osmorregularon en salinidades de 19 a 40 ups. Posteriormente a los 14 DDE a los 28 DDE solo en 5 ups hiper-osmorregularon y a mayores a 12 ups hipo-osmorregularon. Esto implica que la capacidad osmorreguladora de las larvas se ve comprometida en las etapas tempranas (eclosión, apertura de la boca y a los 7 DDE) cuando son sometidas a cambios bruscos a salinidades bajas de 12 y 5 ups.

- Con la información obtenida en este trabajo de tesis es posible declarar que *S. annulatus* posee gran capacidad para aclimatarse a salinidades altas y bajas, después de los 7 DDE esta especie puede ser sometida a cambios de salinidad tanto graduales como repentinos sin afectar su supervivencia, esto implica que puede ser cultivada adecuadamente desde una salinidad de 10 hasta 40 ups, por lo que el botete puede ser mantenido en jaulas dentro de estuarios o marismas sin que las fluctuaciones de salinidad afecten significativamente al desarrollo de los peces. Es posible eliminar algunos parásitos como copépodos y hongos filamentosos usando cambios bruscos de salinidad sin que los embriones,

larvas o juveniles sean afectados negativamente, sin embargo, es delicado someter las larvas a estos cambios en salinidades inferiores a 12 ups cuando tienen una edad menor a los 7 DDE.

PERSPECTIVAS

De este trabajo se desprenden algunas actividades de investigación que complementarían el conocimiento sobre los mecanismos de osmoregulación del botete diana, estas son:

- Evaluar el efecto de salinidades constantes, fluctuantes y de cambios bruscos de salinidad sobre la concentración de iones de Ca^{++} , Mg^{++} , Cl^- , Na^+ y K^+ en la sangre del pez para estudiar su dinámica e importancia en los procesos de osmorregulación en salinidades bajas y altas, además, estudiar las implicaciones energéticas relacionadas en el mantenimiento homeostático de estos iones.
- Estudiar el efecto de diferentes salinidades sobre las concentraciones de cortisol, lactato y glucosa en la sangre de organismos en diferentes etapas de su desarrollo ontogénico, ayudará a determinar el nivel de estrés cuando las larvas sean sometidas a distintas salinidades, y para tener un panorama más amplio de los efectos fisiológicos de la salinidad. Posteriormente evaluar el efecto del estrés sobre el crecimiento de larvas, juveniles y adultos de botete diana, y cómo influye en su demanda energética. Si es posible, determinar el efecto de la salinidad sobre la TCO y la TEA, en diferentes etapas ontogenéticas para poder comparar con lo encontrado en los juveniles y verificar si hay similitudes o diferencias.
- Para completar el patrón de osmorregulación, la CO y el nivel de expresión de la ATPasa de Na^+/K^+ por efecto de las salinidades fluctuantes en juveniles de botete diana, es necesario realizar un experimento el cuál contemple salinidades menores a 17 ups.

- Determinar la localización a nivel celular de la a ANK en las branquias u otros órganos para establecer en qué etapa del desarrollo comienzan a participar en la osmoregulación.
- Esta especie puede ser utilizada como organismo modelo para realizar otros estudios enfocados a entender los procesos de osmorregulación de los peces, debido a su gran capacidad para permanecer en bajas y altas salinidades.
- Es importante realizar investigación enfocada a la nutrición de esta especie. Se deberán probar diferentes dietas con la finalidad de cumplir todo el perfil nutricional que el botete diana requiere, de esta forma se podrá acelerar su crecimiento y obtener resultados similares a los obtenidos en otras especies de peces globo de importancia comercial como *T. rubipres* en Japón. Este tipo estudios nutricionales, es un complemento fundamental a los análisis fisiológicos para poder mejores resultados en el cultivo de *S. annulatus*.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Abdo-de la Parra M. I., García-Ortega A., Martínez-Rodríguez I. et al., 2010. An intensive hatchery rearing protocol for larvae of the bullseye puffer, *Sphoeroides annulatus* (Jenyns). Aquaculture Research. (41): e554-e560.
- Abdo-de la Parra M. I., Martínez-Rodríguez I. E., González-Rodríguez B., Rodríguez-Ibarra L. E., Duncan N. J. y Hernández C., 2012. Efecto de la temperatura y salinidad del agua en la incubación de huevos de botete diana *Sphoeroides annulatus*. Revista de Biología Marina y Oceanografía. (47): 147-153.
- Altinok I. y Grizzle J. M., 2003. Effects of Low Salinities on Oxygen Consumption of Selected Euryhaline and Stenohaline Freshwater Fish. Journal of the World Aquaculture Society. (34): 113-117.
- Álvarez-Cadena J., Cortés-Altamirano N. R. y Mussot-Pérez G. A., 1987. Composición y abundancia de las larvas de peces en el sistema lagunar Huizache-Caimanero, Parte II Tapo Botadero. Anales del Instituto de ciencias del Mar y Limnología UNAM. (15): 143-157.
- Álvarez-Lajonchère L. S. y Hernández-Molejón O., 2001. Producción de juveniles de peces estuarinos para un centro en América Latina y el Caribe: diseño, operación y tecnologías. IN: The World Aquaculture Society, Baton Rouge. pp. 424.
- Arias-Rodríguez L., Rodríguez-Ibarra L. E. y del-Valle-Pignataro G., 2004a. Efecto de la radiación UV en la inactivación genética del esperma de botete diana *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1842). Ciencias Marinas. (30): 391-402.
- Arias-Rodríguez L., Rodríguez-Ibarra L. E. y Valle-Pignataro G. d., 2004b. Effect of UV radiation on the genetic inactivation of sperm of the bullseye puffer *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1842). Ciencias Marinas. (30): 391-402.
- Aristizabal Abud E. O., 1992. Effects of salinity and weight on routine metabolism in the juvenile croaker, *Micropogonias furnieri* (Desmarest 1823). Journal of Fish Biology. (40): 471-472.
- Arjona F. J., Vargas-Chacoff L., Ruiz-Jarabo I. et al., 2009. Tertiary stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) to osmotic challenge: Implications for osmoregulation, energy metabolism and growth. Aquaculture. (287): 419-426.
- Blaber S. J. M., 2012. Fishes and fisheries in tropical estuaries: The last 10 years. Estuarine, Coastal and Shelf Science.
- Bodinier C., Sucré E., Lecurieux-Belfond L., Blondeau-Bidet E. y Charmantier G., 2010a. Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. (157): 220-228.
- Bodinier C., Sucré E., Lecurieux-Belfond L., Blondeau-Bidet E. y Charmantier G., 2010b. Ontogeny of osmoregulation and salinity tolerance in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology. (157): 220-228.
- Bond C. E., 1996. Biology of Fishes, Corvallis, Oregon.
- Brauner C. J. y Rombough P. J., 2012. Ontogeny and paleophysiology of the gill: New insights from larval and air-breathing fish. Respiratory Physiology & Neurobiology.

- Bustin S., 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*. (29): 23-39.
- Bystriansky J. S., Frick N. T., Richards J. G., Schulte P. M. y Ballantyne J. S., 2007. Failure to up-regulate gill Na^+, K^+ -ATPase [alpha]-subunit isoform [alpha]1b may limit seawater tolerance of land-locked Arctic char (*Salvelinus alpinus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*. (148): 332-338.
- Castro-Aguirre J. L., Espinoza-Pérez H. y Schmitter-Soto J. J., 1999. Ictiofauna estuarina, lagunar y vicaria de México, Limusa, México.
- Cerezo Valverde J., Martínez López F.-J. y García García B., 2006. Oxygen consumption and ventilatory frequency responses to gradual hypoxia in common dentex (*Dentex dentex*): Basis for suitable oxygen level estimations. *Aquaculture*. (256): 542-551.
- Claiborne J. B., Choe K. P., Morrison-Shetlar A. I. et al., 2008. Molecular detection and immunological localization of gill Na^+/H^+ exchanger in the dogfish (*Squalus acanthias*). *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. (294): R1092-R1102.
- Claireaux G. y Lagardère J. P., 1999. Influence of temperature, oxygen and salinity on the metabolism of the European sea bass. *Journal of Sea Research*. (42): 157-168.
- Chávez-Sánchez M. C., Álvarez-Lajonchère L., Abdo de la Parra M. I. y García Aguilar N., 2008. Advances in the culture of the Mexican bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*, Jenyns (1842). *Aquaculture Research*. (39): 718-730.
- da Silva Rocha A. J., Gomes V., Van Ngan P., de Arruda Campos Rocha Passos M. J. y Rios Furia R., 2005. Metabolic demand and growth of juveniles of *Centropomus parallelus* as function of salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. (316): 157-165.
- Deane E. E. y Woo N. Y. S., 2004. Differential gene expression associated with euryhalinity in sea bream (*Sparus sarba*). *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. (287): R1054-R1063.
- Díaz F., Farfan C., Sierra E. y Re A. D., 2001. Effects of temperature and salinity fluctuation on the ammonium excretion and osmoregulation of juveniles of *Penaeus vannamei*, Boone. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. (34): 93-104.
- Díaz F., Re A. D., González R. A., Sánchez L. N., Leyva G. y Valenzuela F., 2007. Temperature preference and oxygen consumption of the largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacépède) acclimated to different temperatures. *Aquaculture Research*. (38): 1387-1394.
- Duncan N. J., Garcia-Aguilar N., Rodríguez-M. de O G. et al., 2003. Reproductive biology of captive bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*), LHRHa induced spawning and egg quality. *Fish Physiology and Biochemistry*. (28): 505-506.
- Evans D. H., Piermarini P. M. y Choe K. P., 2005. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiological Reviews*. (85): 97-177.
- Evans D. H., Piermarini P. M. y Potts W. T. W., 1999. Ionic transport in the fish gill epithelium. *Journal of Experimental Zoology*. (283): 641-652.
- Evans T. G., 2010. Co-ordination of osmotic stress responses through osmosensing and signal transduction events in fishes. *Journal of Fish Biology*. (76): 1903-1925.
- Fajer-Ávila E. J., Martínez-Rodríguez I., Abdo de la Parra M. I., Álvarez-Lajonchere L. y Betancourt-Lozano M., 2008. Effectiveness of freshwater treatment against *Lepeophtheirus simplex*

- (Copepoda: Caligidae) and *Neobenedenia* sp. (Monogenea: Capsalidae), skin parasites of bullseye puffer fish, *Sphoeroides annulatus* reared in tanks. *Aquaculture*. (284): 277-280.
- Fajer-Ávila E. J., Roque A., Aguilar G. y Duncan N., 2004. Patterns of Occurrence of the Platyhelminth Parasites of the Wild Bullseye Puffer (*Sphoeroides annulatus*) Off Sinaloa, Mexico. *Journal of Parasitology*. (90): 415-418.
- FAO, 1995. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca - Pacífico Centro-Oriental., Organización de las Naciones Unidas Para la Agricultura y la Alimentación, Roma.
- Fielder D. S., Allan G. L., Pepperall D. y Pankhurst P. M., 2007. The effects of changes in salinity on osmoregulation and chloride cell morphology of juvenile Australian snapper, *Pagrus auratus*. *Aquaculture*. (272): 656-666.
- Fielder D. S., Bardsley W. J., Allan G. L. y Pankhurst P. M., 2005. The effects of salinity and temperature on growth and survival of Australian snapper, *Pagrus auratus* larvae. *Aquaculture*. (250): 201-214.
- Fiess J. C., Kunkel-Patterson A., Mathias L. et al., 2007. Effects of environmental salinity and temperature on osmoregulatory ability, organic osmolytes, and plasma hormone profiles in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*. (146): 252-264.
- Flores M., Diaz F., Medina R., Re A. D. y Licea A., 2008. The Effect of Dietary Astaxanthin on Physiological Responses of Juvenile White Shrimp *Litopenaeus vannamei* Acclimated to Low-Salinity Water. *Journal of Fisheries International*. (3): 75-82.
- Foss A., Evensen T. H., Imsland A. K. y Ølestad V., 2001. Effects of reduced salinities on growth, food conversion efficiency and osmoregulatory status in the spotted wolffish. *Journal of Fish Biology*. (59): 416-426.
- Fridman S., Bron J. y Rana K., 2012a. Influence of salinity on embryogenesis, survival, growth and oxygen consumption in embryos and yolk-sac larvae of the Nile tilapia. *Aquaculture*. (334–337): 182-190.
- Fridman S., Bron J. E. y Rana K. J., 2012b. Ontogenic changes in the osmoregulatory capacity of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and implications for aquaculture. *Aquaculture*. (356–357): 243-249.
- García-Gasca A., Galaviz M. A., Gutiérrez J. N. y García-Ortega A., 2006. Development of the digestive tract, trypsin activity and gene expression in eggs and larvae of the bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*. *Aquaculture*. (251): 366-376.
- García-Ortega A., 2009. Nutrition and feeding research in the spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) and bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*), new species for marine aquaculture. *Fish Physiology and Biochemistry*. (35): 69-80.
- Giffard-Mena I., Boulo V., Abed C., Cramb G. y Charmantier G., 2011. Expression and localization of Aquaporin 1a in the sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) during ontogeny. *Frontiers in Physiology*. (2).
- Gracia-López V., Rosas-Vázquez C. y Brito-Pérez R., 2006. Effects of salinity on physiological conditions in juvenile common snook *Centropomus undecimalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*. (145): 340-345.
- Hall T. E., 2010. Ontogeny. IN: Fish larval physiology. Finn R. N. y Kapoor B. G. (ed). Science Publishers. Enfield, New Hampshire. 3-25. pp.

- Haney D. C. y Nordlie F. G., 1997a. Influence of Environmental Salinity on Routine Metabolic Rate and Critical Oxygen Tension of *Cyprinodon variegatus*. *Physiological Zoology*. (70): 511-518.
- Haney D. C. y Nordlie F. G., 1997b. Influence of environmental salinity on routine metabolic rate and critical oxygen tension of *Cyprinodon variegatus*. *Physiological Zoology*. (70): 511-518.
- Heid C. A., Stevens J., Livak K. J. y Williams P. M., 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research*. (6): 986-994.
- Herrera M., Vargas-Chacoff L., Hachero I. et al., 2009. Osmoregulatory changes in wedge sole (*Dicologlossa cuneata* Moreau, 1881) after acclimation to different environmental salinities. *Aquaculture Research*. (40): 762-771.
- Hiroi J., McCormick S. D., Ohtani-Kaneko R. y Kaneko T., 2005. Functional classification of mitochondrion-rich cells in euryhaline Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos, by means of triple immunofluorescence staining for Na^+/K^+ -ATPase, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter and CFTR anion channel. *Journal of Experimental Biology*. (208): 2023-2036.
- Hirose S., Kaneko T., Naito N. y Takei Y., 2003. Molecular biology of major components of chloride cells. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. (136): 593-620.
- Ibarra-Castro L., Lizarraga-Osuna C. R., Gómez-Gil B. y Alvarez-Lajonchère L., 2012. Tratamientos profilácticos para desinfectar la superficie de huevos del pargo flamenco *Lutjanus guttatus*. *Revista de biología marina y oceanografía*. (47): 155-160.
- Imsland A. K., Gunnarsson S., Foss A. y Stefansson S. O., 2003. Gill Na^+ , K^+ -ATPase activity, plasma chloride and osmolality in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) reared at different temperatures and salinities. *Aquaculture*. (218): 671-683.
- Jensen M. K., Madsen S. S. y Kristiansen K., 1998. Osmoregulation and salinity effects on the expression and activity of Na^+/K^+ -ATPase in the gills of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Experimental Zoology*. (282): 290-300.
- Kaneko T., Hasegawa S., Takagi Y., Tagawa M. y Hirano T., 1995. Hypoosmoregulatory ability of eyed-stage embryos of chum salmon. *Marine Biology*. (122): 165-170.
- Kaneko T. y Hiroi J., 2008. Osmo- and ionregulation. IN: Fish larval physiology. Finn R. N. y Kapoor B. G. (ed). Sinecne Publishers. Enfield, New Hampshire. 163-183. pp.
- Kaneko T., Shiraishi K., Katoh F., Hasegawa S. y Hiroi J., 2002. Chloride cells during early life stages of fish and their functional differentiation. *Fisheries Science*. (68): 1-9.
- Kang C.-K., Tsai H.-J., Liu C.-C., Lee T.-H. y Hwang P.-P., 2010. Salinity-dependent expression of a Na^+ , K^+ , 2Cl^- cotransporter in gills of the brackish medaka *Oryzias dancena*: A molecular correlate for hyposmoregulatory endurance. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*. (157): 7-18.
- Kang C.-K., Tsai S.-C., Lee T.-H. y Hwang P.-P., 2008. Differential expression of branchial Na^+/K^+ -ATPase of two medaka species, *Oryzias latipes* and *Oryzias dancena*, with different salinity tolerances acclimated to fresh water, brackish water and seawater. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*. (151): 566-575.
- Kato A., Doi H., Nakada T., Sakai H. y Hirose S., 2005. Takifugu obscurus is a euryhaline fugu species very close to *Takifugu rubripes* and suitable for studying osmoregulation. *BMC Physiology*. (5): 18.

- Katoh F., Shimizu A., Uchida K. y Kaneko T., 2000. Shift of Chloride Cell Distribution during Early Life Stages in Seawater-Adapted Killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Zoological Science*. (17): 11-18.
- Kikuchi K., Furuta T., Iwata N., Onuki K. y Noguchi T., 2009. Effect of dietary lipid levels on the growth, feed utilization, body composition and blood characteristics of tiger puffer *Takifugu rubripes*. *Aquaculture*. (298): 111-117.
- Kikuchi K., Iwata N., Kawabata T. y Yanagawa T., 2006. Effect of Feeding Frequency, Water Temperature, and Stocking Density on the Growth of Tiger Puffer, *Takifugu rubripes*. *Journal of the World Aquaculture Society*. (37): 12-20.
- Kimmel C. B., Ballard W. W., Kimmel S. R., Ullmann B. y Schilling T. F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*. (203): 253-310.
- Kinne O., 1967. Physiology of estuarine organisms with special reference to salinity and temperature; general aspects. IN: *Estuaries* (ed Lauff G. H.). pp. 525-540.
- Komar C., Turnbull J. F., Roque A., Fajer E. y Duncan N. J., 2004. Effect of water treatment and aeration on the percentage hatch of demersal, adhesive eggs of the bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*). *Aquaculture*. (229): 147-158.
- Koumoundouros G., Ashton C., Xenikoudakis G., Giopanou I., Georgakopoulou E. y Stickland N., 2009. Ontogenetic differentiation of swimming performance in Gilthead seabream (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758) during metamorphosis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. (370): 75-81.
- Kucera C. J., Faulk C. K. y Holt G. J., 2002. The effect of parental acclimation to spawning salinity on the survival of larval *Cynoscion nebulosus*. *Journal of Fish Biology*. (61): 726-738.
- Lai-Carrión R., Guerreiro P. M., Fuentes J., Canario A. V. M., Martín Del Río M. P. y Mancera J. M., 2005. Branchial osmoregulatory response to salinity in the gilthead sea bream, *Sparus auratus*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*. (303A): 563-576.
- Laverty G. y Skadhauge E., 2012. Adaptation of teleosts to very high salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. (163): 1-6.
- Lee K., Kaneko T. y Aida K., 2005. Low-salinity tolerance of juvenile fugu *Takifugu rubripes*. *Fisheries Science*. (71): 1324-1331.
- Lignot J. H., Spanings-Pierrot C. y Charmantier G., 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture*. (191): 209-245.
- Lin C. H., Tsai R. S. y Lee T. H., 2004a. Expression and distribution of Na, K-ATPase in gill and kidney of the spotted green pufferfish, *Tetraodon nigroviridis*, in response to salinity challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*. (138): 287-295.
- Lin C. H., Tsai R. S. y Lee T. H., 2004b. Expression and distribution of Na⁺, K⁺-ATPase in gill and kidney of the spotted green pufferfish, *Tetraodon nigroviridis*, in response to salinity challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*. (138): 287-295.
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P. et al., 2005. *Biología Celular y Molecular*, Panamericana, Buenos Aires.
- Lønning S. y Davenport J., 1980. The swelling egg of the long rough dab, *Hippoglossoides platessoides limandoides* (Bloch). *Journal of Fish Biology*. (17): 359-378.

- Lorin-Nebel C., Boulo V., Bodinier C. y Charmantier G., 2006. The Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter in the sea bass *Dicentrarchus labrax* during ontogeny: involvement in osmoregulation. *Journal of Experimental Biology*. (209): 4908-4922.
- Lundgreen K., Kiilerich P., Tipsmark C., Madsen S. y Jensen F., 2008. Physiological response in the European flounder (*Platichthys flesus*) to variable salinity and oxygen conditions. *J Comp Physiol B*. (178): 909-915.
- Marshall W. S., 2002. Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ and Zn²⁺ transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. *Journal of Experimental Zoology*. (293): 264-283.
- Marshall W. S. y Grosell M., 2006. Ion transport, osmoregulation, and acid-base balance. IN: The physiology of fishes. Evans D. H. y Claiborne J. B. (ed). CRC. Taylor & Francis. Boca Raton, FL. 177-230. pp.
- Martínez-Chavez C. C., García-Aguilar N. y Duncan N. J., 2003. Comparison of egg quality between wild and captive bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*). *Fish Physiology and Biochemistry*. (28): 509-510.
- Mary L. M. y Lawrence R. G., 1989. Differential Effects of Salinity Changes on Two Estuarine Fishes, *Leiostomus xanthurus* and *Micropogonias undulatus*. *Estuaries*. (12): 35-41.
- Mayzaud P. y Conover R. J., 1988. O:N atomic ratio as a tool to describe zooplankton metabolism. *Marine Ecology Progress Series*. (45): 289-302.
- McCormick S. D., 1993. Methods for Nonlethal Gill Biopsy and Measurement of Na⁺, K⁺-ATPase Activity. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. (50): 656-658.
- McCormick S. D., 2001. Endocrine Control of Osmoregulation in Teleost Fish. *American Zoologist*. (41): 781-794.
- Methling C., Aluru N., Vijayan M. M. y Steffensen J. F., 2010. Effect of moderate hypoxia at three acclimation temperatures on stress responses in Atlantic cod with different haemoglobin types. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*. (156): 485-490.
- Moser M. L. y Hettler W. F., 1989. Routine metabolism of juvenile spot, *Leiostomus xanthurus* (Lacépède), as a function of temperature, salinity and weight. *Journal of Fish Biology*. (35): 703-707.
- Moser M. L. y Miller J. M., 1994. Effects of salinity fluctuation on routine metabolism of juvenile spot, *Leiostomus xanthurus*. *Journal of Fish Biology*. (45): 335-340.
- Nebel C., Romestand B., Nègre-Sadargues G. et al., 2005. Differential freshwater adaptation in juvenile sea-bass *Dicentrarchus labrax*: involvement of gills and urinary system. *The Journal of Experimental Biology*. (208): 3859-3871.
- Niklitschek E. J. y Secor D. H., 2009. Dissolved oxygen, temperature and salinity effects on the ecophysiology and survival of juvenile *Atlantic sturgeon* in estuarine waters: II. Model development and testing. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. (381, Supplement): S161-S172.
- Nordlie F. G., 1978. The influence of environmental salinity on respiratory oxygen demands in the euryhaline teleost, *Ambassis interrupta bleeker*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. (59): 271-274.
- Nordlie F. G., Haney D. C. y Walsh S. J., 1992. Comparisons of Salinity Tolerances and Osmotic Regulatory Capabilities in Populations of Sailfin Molly (*Poecilia latipinna*) from Brackish and Fresh Waters. *Copeia*. (3): 741-746.
- Núñez-Vazquez E. J., García-Ortega A., Campa-Cordova A. I. et al., 2012. Toxicity of Cultured Bullseye Puffer Fish *Sphoeroides annulatus*. *Marine Drugs*. (10): 329-339.

- Okamoto T., Kurokawa T., Gen K. et al., 2009. Influence of salinity on morphological deformities in cultured larvae of Japanese eel, *Anguilla japonica*, at completion of yolk resorption. *Aquaculture*. (293): 113-118.
- Ostrowski A. D., Watanabe W. O., Montgomery F. P., Rezek T. C., Shafer T. H. y Morris Jr J. A., 2011. Effects of salinity and temperature on the growth, survival, whole body osmolality, and expression of Na⁺/K⁺ ATPase mRNA in red porgy (*Pagrus pagrus*) larvae. *Aquaculture*. (314): 193-201.
- Pérez-Robles J., Re A. D., Giffard-Mena I. y Díaz F., 2012. Interactive effects of salinity on oxygen consumption, ammonium excretion, osmoregulation and Na⁺/K⁺-ATPase expression in the bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*, Jenyns 1842). *Aquaculture Research*. (43): 1372-1383.
- Plaut I., 2000. Resting Metabolic Rate, Critical Swimming Speed, and Routine Activity of the Euryhaline Cyprinodontid, *Aphanius dispar*, Acclimated to a Wide Range of Salinities. *Physiological and Biochemical Zoology*. (73): 590-596.
- Prodocimo V. y Freire C. A., 2004. Estuarine pufferfishes (*Sphoeroides testudineus* and *S. Greeleyi*) submitted to sea water dilution during ebb tide: a field experiment. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. (37): 1-5.
- Prodocimo V. y Freire C. A., 2006. The Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter of estuarine pufferfishes (*Sphoeroides testudineus* and *S. greeleyi*) in hypo- and hyper-regulation of plasma osmolality. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. (142): 347-355.
- Ramakers C., Ruijter J. M., Deprez R. H. L. y Moorman A. F. M., 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*. (339): 62-66.
- Reyes I., Díaz F., Re A. D. y Pérez J., 2011. Behavioral thermoregulation, temperature tolerance and oxygen consumption in the Mexican bullseye puffer fish, *Sphoeroides annulatus* Jenyns (1842), acclimated to different temperatures. *Journal of Thermal Biology*. (36): 200-205.
- Rodier J., 1998. Análisis de aguas: Naturales, aguas residuales y aguas de mar, Barcelona, España.
- Rodríguez-Ibarra L. E., Abdo-de la Parra M. I., Rodríguez-Montes de Oca G. A. et al., 2010. Evaluación de métodos para la eliminación de la capa adherente de los huevos del botete diana *Sphoeroides annulatus* (Pisces: Tetraodontidae). *Revista de biología marina y oceanografía*. (45): 147-151.
- Roldán-Pérez G. y Ramírez-Restrepo J. J., 2008. Fundamentos de limnología neotropical.
- Salvato B., Cuomo V., Di Muro P. y Beltramini M., 2001. Effects of environmental parameters on the oxygen consumption of four marine invertebrates: a comparative factorial study. *Marine Biology*. (138): 659-668.
- Sambrook J. y Russell D. W., 2001. Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Sampaio L. s. A. y Bianchini A., 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. (269): 187-196.
- Sánchez-Cárdenas R., Arellano-Martínez M., Valdez-Pineda M. C., Morán-Angulo R. E. y Ceballos-Vázquez B. P., 2011. Reproductive cycle and sexual maturity of *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1842) (Tetraodontiformes, Tetraodontidae) from the coast of Mazatlan, Sinaloa, Mexico. *Journal of Applied Ichthyology*. (27): 1190-1196.

- Sánchez-Cárdenas R., Ceballos-Vázquez B. P., Arellano-Martínez M., Valdez-Pineda M. C. y Morán-Angulo R. E., 2007. Reproductive aspects of *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1842) (Tetraodontiformes, Tetraodontidae) inhabiting the Mazatlan coast, Sinaloa, Mexico. *Revista de biología marina y oceanografía*. (42): 385-392.
- Sangiao-Alvarellos S., Arjona F. J., Míguez J. M., Martín del Río M. P., Soengas J. L. y Mancera J. M., 2006. Growth hormone and prolactin actions on osmoregulation and energy metabolism of gilthead sea bream (*Sparus auratus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*. (144): 491-500.
- Sangiao-Alvarellos S., Laiz-Carrión R., Guzmán J. M. et al., 2003. Acclimation of *S. aurata* to various salinities alters energy metabolism of osmoregulatory and nonosmoregulatory organs. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. (285): R897-R907.
- Scott G. R., Richards J. G., Forbush B., Isenring P. y Schulte P. M., 2004. Changes in gene expression in gills of the euryhaline killifish *Fundulus heteroclitus* after abrupt salinity transfer. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. (287): C300-C309.
- Scheiner-Bobis G., 2002. The sodium pump. *European Journal of Biochemistry*. (269): 2424-2433.
- Shi Y., Zhang G., Liu J. y Zang W., 2011. Effects of temperature and salinity on oxygen consumption of tawny puffer *Takifugu flavidus* juvenile. *Aquaculture Research*. (42): 301-307.
- Shi Y., Zhang G., Zhu Y. y Liu J., 2010. Effects of photoperiod, temperature, and salinity on growth and survival of obscure puffer *Takifugu obscurus* larvae. *Aquaculture*. (309): 103-108.
- Shi Z., Huang X., Fu R. et al., 2008. Salinity stress on embryos and early larval stages of the pomfret *Pampus punctatissimus*. *Aquaculture*. (275): 306-310.
- Stern S., Borut A. y Cohen D., 1984. The effect of salinity and ion composition on oxygen consumption and nitrogen excretion of *Macrobrachium rosenbergii* (de man). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. (79): 271-274.
- Sucré E., Bossus M., Bodinier C. et al., 2012. Osmoregulatory response to low salinities in the European sea bass embryos: a multi-site approach. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*. 1-15.
- Sucré E., Charmantier-Daures M., Grousset E. y Cucchi-Mouillot P., 2011. Embryonic ionocytes in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Structure and functionality. *Development, Growth & Differentiation*. (53): 26-36.
- Swanson C., 1998. Interactive effects of salinity on metabolic rate, activity, growth and osmoregulation in the euryhaline milkfish (*Chanos chanos*). *Journal of Experimental Biology*. (201): 3355-3366.
- Tipsmark C. K., Madsen S. S., Seidelin M., Christensen A. S., Cutler C. P. y Cramb G., 2002. Dynamics of Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransporter and Na⁺,K⁺-ATPase expression in the branchial epithelium of brown trout (*Salmo trutta*) and atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Experimental Zoology*. (293): 106-118.
- Tran-Duy A., Schrama J. W., van Dam A. A. y Verreth J. A. J., 2008. Effects of oxygen concentration and body weight on maximum feed intake, growth and hematological parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*. (275): 152-162.
- Tse W. K. F., Au D. W. T. y Wong C. K. C., 2006. Characterization of ion channel and transporter mRNA expressions in isolated gill chloride and pavement cells of seawater acclimating eels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (346): 1181-1190.

- Uchida K., Kaneko T., Miyazaki H., Hasegawa S. y Hirano T., 2000. Excellent salinity tolerance of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*): elevated chloride cell activity in the branchial and opercular epithelia of the fish adapted to concentrated seawater. *Zoological Science*. (17): 149-160.
- Val A. L., Almeida-Val V. M. F. d. y Randall. D. J., 2006. Tropical environment. IN: The physiology of tropical fishes Val A. L., Almeida-Val V. M. F. d. y Randall. D. J. (ed). Academic Press. New York. 38. pp.
- Varsamos S., Connes R., Diaz J. P., Barnabé G. y Charmantier G., 2001. Ontogeny of osmoregulation in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Marine Biology*. (138): 909-915.
- Varsamos S., Diaz J., Charmantier G., Blasco C., Connes R. y Flik G., 2002. Location and morphology of chloride cells during the post-embryonic development of the european sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Anatomy and Embryology*. (205): 203-213.
- Varsamos S., Nebel C. y Charmantier G., 2005. Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: A review. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*. (141): 401-429.
- Vinogradov M. E., 1997. Some Problems of Vertical Distribution of Meso- and Macroplankton in the Ocean. IN: *Advances in Marine Biology*. J.H.S. Blaxter A. J. S. A. V. G. E. C. S. y Tyler P. A. (ed). Academic Press. 1-92. pp.
- Wendelaar Bonga S. E., 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews*. (77): 591-625.
- Woo N. Y. S. y Kelly S. P., 1995. Effects of salinity and nutritional status on growth and metabolism of *Sparus sarba* in a closed seawater system. *Aquaculture*. (135): 229-238.
- Wright P. A., Part P. y Wood C. M., 1995. Ammonia and urea excretion in the tidepool sculpin (*Oligocottus maculosus*): sites of excretion, effects of reduced salinity and mechanisms of urea transport. *Fish Physiology and Biochemistry*. (14): 111-123.
- Wuenschel M. J., Jugovich A. R. y Hare J. A., 2005. Metabolic response of juvenile gray snapper (*Lutjanus griseus*) to temperature and salinity: Physiological cost of different environments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. (321): 145-154.
- Yan M., Li Z., Xiong B. y Zhu J., 2004. Effects of salinity on food intake, growth, and survival of pufferfish (*Fugu obscurus*). *Journal of Applied Ichthyology*. (20): 146-149.
- Yanagie R., Lee K. M., Watanabe S. y Kaneko T., 2009. Ontogenic change in tissue osmolality and developmental sequence of mitochondria-rich cells in Mozambique tilapia developing in freshwater. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. (154): 263-269.
- Yang Z. y Chen Y., 2006. Salinity tolerance of embryos of obscure puffer *Takifugu obscurus*. *Aquaculture*. (253): 393-397.
- Yoshikawa J. S. M., McCormick S. D., Young G. y Bern H. A., 1993. Effects of salinity on chloride cells and Na⁺ K⁺-ATPase activity in the teleost *Gillchthys mirabilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. (105): 311-317.
- Zhang G., Shi Y., Zhu Y., Liu J. y Zang W., 2010. Effects of salinity on embryos and larvae of tawny puffer *Takifugu flavidus*. *Aquaculture*. (302): 71-75.
- Zheng Z., Jin C., Li M., Bai P. y Dong S., 2008. Effects of temperature and salinity on oxygen consumption and ammonia excretion of juvenile miiuy croaker, *Miichthys miiuy* (Basilewsky). *Aquaculture International*. (16): 581-589.