

Ácidos nucleicos para evaluar la condición de larvas de peces

Roberto Mendoza Alfaro, Carlos Aguilera González, Lucía Carreón Martínez*

El crecimiento y sobrevivencia de las larvas de peces depende, en gran medida, de su alimentación, la cual, a su vez, está determinada tanto por la disponibilidad de alimento, como por su habilidad para consumirlo durante el periodo crítico de la reabsorción del vitelo.¹ De aquí que este aspecto haya sido considerado como fundamental en el manejo de los recursos pesqueros.² Con relación a esto, se ha venido desatando cierta polémica, ya que si bien por un lado se argumenta que la inanición es la principal causa de mortalidad en larvas de peces en medio natural, por el otro, estudios de campo han revelado que la proporción de éstas en inanición es relativamente baja.³ Sin embargo, ha sido posible constatar que aquellas larvas con una pobre condición nutricional son removidas selectivamente de la población como consecuencia de su mayor vulnerabilidad a la predación en comparación con aquellas en buen estado nutricional. Así, la inanición y la predación se encuentran inherentemente relacionadas, haciendo difícil separar sus efectos individualmente. En efecto, una condición nutricional pobre origina tasas de crecimiento reducidas y prolonga la duración de la etapa larvaria, lo que trae como resultado un aumento en la susceptibilidad a la predación, causando, por consiguiente, una reducción en la sobrevivencia.⁴

Punto de no retorno

Las larvas de la mayoría de los peces requieren alimentarse en un corto periodo, antes de que se agoten sus reservas de vitelo. Al periodo durante el cual comienzan su alimentación exógena, pero aún utilizan sus reservas, se le ha denominado *Periodo de alimentación mixta*, durante este lapso la larva debe asegurar su alimentación exógena para evitar morir



de inanición. En contra parte, se ha denominado *Punto de no retorno (PNR)* al umbral a partir del cual, ya no se restituyen las capacidades físicas de las larvas, llevándolas irreversiblemente a la muerte, debido a la inanición.⁵ Algunas particularidades de este periodo son las siguientes:

- a. La habilidad para alimentarse aumenta durante las etapas iniciales de la inanición y se mantiene una alta sobrevivencia, hasta que la larva entra en el *PNR*. Esto se ha propuesto como una respuesta adaptativa a la inanición.
- b. En condiciones de alimentación por abajo del óptimo, se puede apreciar un incremento en la actividad natatoria o de tiempo destinado a la búsqueda del alimento. Se ha sugerido que la reducción en el crecimiento antes del *PNR* es causada por la energía invertida en la búsqueda de alimento.
- c. El tiempo que tarda una larva de mayor tamaño para alcanzar el *PNR* es más prolongado, de-

* Grupo Ecofisiología de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. E-mai: rmendoza@ccr.dsi.uanl.

bido a la existencia de mayores reservas.

Factores de condición para larvas de peces

Considerando lo anterior, en los últimos años, el principal objeto de preocupación de la mayoría de los biólogos pesqueros y acuacultores ha sido la determinación de la condición nutricional y el PNR, tanto de las larvas capturadas en su medio ambiente natural, como de aquéllas mantenidas en cautiverio. La condición de las larvas ha sido estimada por medio de diferentes parámetros, los cuales a menudo se dividen en tres niveles de organización.

A nivel del organismo, el interés se focaliza en la detección de cambios morfológicos, que reflejan la condición de la larva. Estos cambios se expresan comúnmente como tasas o vectores multivariados de medidas corporales. Sin embargo, los resultados de estas estimaciones no han sido lo suficientemente explícitos, debido a la pérdida concurrente de peso y longitud durante la inanición, así como a cambios independientes de la condición nutricional, a través del desarrollo de las larvas, como resultado del crecimiento alométrico y la osificación del esqueleto.⁵

A nivel tisular, debido a que la histología de una larva en inanición difiere de aquéllas que han sido bien alimentadas, la "condición" de la larva se detecta a través del análisis de modificaciones en la apariencia de las células y su arreglo en diferentes tejidos. Sin embargo, estos métodos requieren de mucho tiempo y personal con experiencia para realizar con precisión las observaciones histológicas. De igual manera, los estudios comparativos de la dinámica fisiológica y comportamental de las larvas de peces se han visto limitados, debido a la carencia de una medida conveniente, consistente y universal para estimar con precisión las distintas etapas ontogenéticas de su desarrollo.⁶ El principal argumento se centra en el hecho de que estas estimaciones no establecen una relación directa con los procesos celulares determinantes del crecimiento.

Finalmente, a nivel bioquímico, la condición puede estimarse por medio de la cuantificación de los constituyentes químicos utilizados como sustratos energéticos. Sin embargo, tanto el almacenamiento de energía después de la alimentación, como su movilización después o durante la inanición resultan muy complejos cuando se pretenden estimar a nivel celular, debido a la gran cantidad de sustratos energéticos y vías metabólicas disponibles. Además, se ha suge-

rido que el patrón de movilización de las diferentes biomoléculas puede diferir entre las especies. Ante esta situación, se ha considerado como una alternativa, el análisis de la composición de los ácidos nucleicos, particularmente de la relación RNA/DNA, ya que a través de su estudio se pueden inferir funciones relacionadas con la formación de los tejidos y por ende de la condición fisiológica del individuo.⁷

Principio del índice RNA/DNA

La información genética de las células, contenida dentro de los núcleos y codificada en la secuencia de nucleótidos de la doble hélice del ácido desoxirribonucleico (DNA), se hace funcionalmente disponible a través de la síntesis de moléculas complementarias de ácido ribonucleico (RNA), las cuales son transferidas al citoplasma, donde sirven de molde para la biosíntesis de proteínas. En consecuencia, el estudio de la concentración de los ácidos nucleicos, en los tejidos de los individuos durante las diferentes etapas de su desarrollo, reviste especial interés para obtener una mejor comprensión de la fisiología de los organismos.⁸

El principio teórico de la utilización de la relación RNA/DNA asume que el contenido de DNA es virtualmente constante en las células somáticas, de tal manera que las concentraciones tisulares reflejan el número de células y es independiente de la condición nutricional. Mientras que, la cantidad de RNA celular, y principalmente de RNA ribosomal (RNAr) disponible en los tejidos, es directamente proporcional al nivel de síntesis de proteínas, por lo cual puede verse afectada por la condición nutricional (figura 1). Así, la relación RNA/DNA resultante refleja la intensidad metabólica celular y ha sido utilizada para medir la condición y el crecimiento potencial de las larvas de peces de diferentes especies.²

En una larva bien alimentada la cantidad de RNA y la actividad de los ribosomas es alta (figura 2). Sin embargo, cuando el alimento es retirado, la actividad de los ribosomas decrece (fase 1), y si la larva continúa aún sin alimentarse los ribosomas comienzan a degradarse y a perderse RNA (fase 2). Finalmente, el contenido de RNA puede disminuir más aún si se extiende el periodo de inanición, alcanzando un límite que indica la relación RNA/DNA necesaria para sobrevivir (fase 3). Este valor de RNA/DNA parece ser de 1.0, independientemente de la especie. La escala de tiempo de la reacción para las fases 1-



Fig. 1. Factor de condición RNA/DNA en larvas de peces.

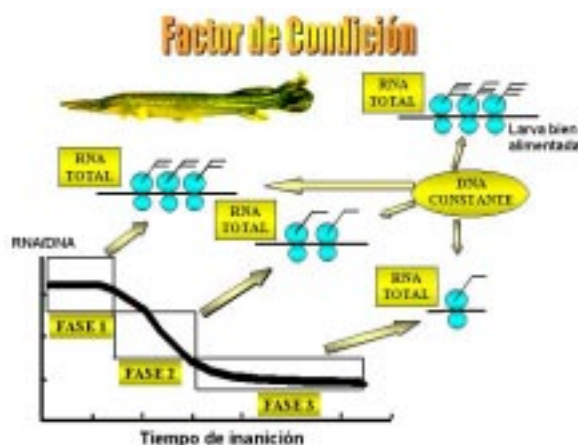


Fig. 2. Influencia de la inanición sobre la tasa RNA/DNA.

3 depende de la especie, edad y temperatura. Así, las larvas más grandes son por lo general más resistentes a la inanición y requieren de mayor tiempo para llegar a la fase 3, mientras que una mayor temperatura implica una degradación más rápida de los ribosomas y por consecuencia, un menor tiempo para alcanzar esta fase.

El RNAr representa más del 90% del RNA celular, por lo tanto los cambios en la relación RNA/DNA estarán más relacionados con cambios en la relación de síntesis ribosomal, el *turnover* de los ribosomas, o una combinación de ambos mecanis-

mos. Por consiguiente, el aumento en la relación de crecimiento y la relación RNA/DNA sería el resultado de un incremento en la síntesis de RNAr y la formación de nuevas ribosomas, o un aumento en la eficiencia de los ribosomas al inicio de la síntesis de proteínas, en conjunto con un *turnover* más bajo de los ribosomas en los tejidos.⁹ Sin embargo, este incremento de la cantidad de RNAr se acompaña de un aumento de la translación y por lo tanto de la síntesis de las proteínas celulares.

Adicionalmente, la reducción en la síntesis de proteínas, relacionada con la reducción en la cantidad de RNAr muscular y la disminución de la eficiencia en la incorporación de aminoácidos, parece ser responsable del decremento de la relación RNA/DNA durante la inanición.⁴ Por otra parte, los altos valores de DNA registrados en organismos en inanición indican que las sustancias intracelulares, tales como proteínas, carbohidratos y lípidos, son catabolizados durante el ayuno y que el tamaño y peso celular son reducidos.⁷

Para ejemplificar la utilización de esta técnica se presentan a continuación los resultados de un estudio de evaluación nutricional en el que se probaron dos dietas artificiales con diferencias, tanto en flotabilidad como en contenido de proteína en larvas de catán (*Atractosteus spatula*).¹⁰ Las dietas fueron comparadas con el alimento vivo (*Artemia salina*) que se suministra de manera tradicional a las larvas y con un testigo negativo, al cual no se le suministró alimento durante el periodo de estudio.

Los resultados revelaron que las larvas alimentadas con las dietas artificiales alcanzaron una mayor longitud total (LT) (figura 3) y mayor peso (figura 4) que aquellos individuos alimentados con *Artemia salina* y que larvas mantenidas en inanición, las cuales murieron después de 9 días. Estos resultados fueron corroborados con la tasa RNA/DNA del músculo de las larvas de los diferentes tratamientos (figura 5) y se observó la misma tendencia, permitiendo concluir de esta manera que se trataba de un indicador adecuado del aprovechamiento nutricional de las dietas.

Alternativas a la relación RNA/DNA utilizadas como índices de condición

Concentración de RNA

La relación RNA/DNA ha sido considerada como un indicador más preciso del crecimiento que la simple concentración de RNA, ya que esta relación no se ve

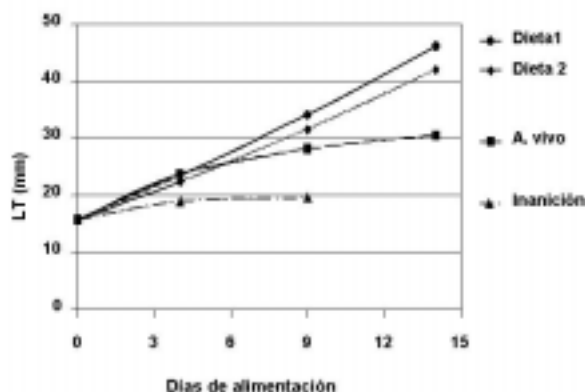


Fig. 3. Crecimiento en longitud total (LT) de larvas de catán alimentadas con diferentes dietas.

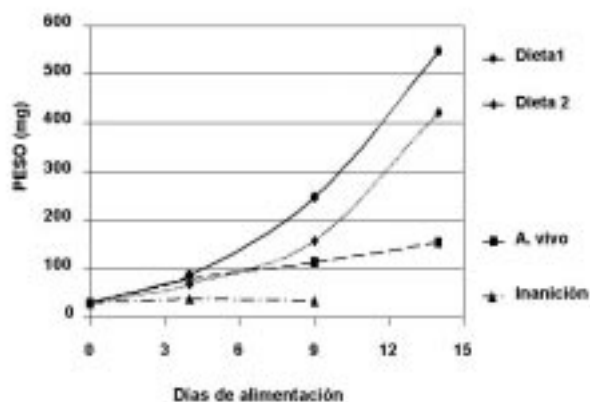


Fig. 4. Crecimiento ponderal (mg) de larvas de catán alimentadas con diferentes dietas.

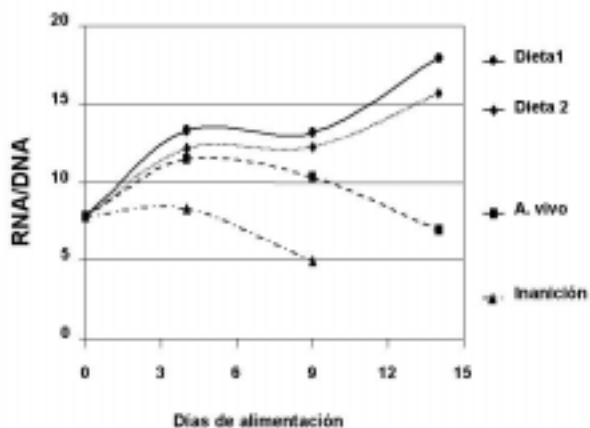


Fig. 5. Tasa RNA/DNA de larvas de catán alimentadas con diferentes dietas.

afectada por el número de células. Sin embargo, se ha reportado que la sola estimación de la concentración de RNA puede ser un buen indicador del crecimiento. Inclusive, se ha argumentado que puede resultar de mayor utilidad que la estimación de la relación RNA/DNA, ya que esta relación está influenciada no sólo por el contenido de RNA, sino también por la concentración nuclear y el tamaño de las células.¹¹ En contraste, se ha reportado que la concentración de DNA, además de ser un indicador del número de células, no es sensible a los cambios en las condiciones ambientales. De aquí que la relación RNA/DNA sea un índice más preciso de la actividad metabólica que la estimación de la concentración de RNA.¹²

Relación DNA/peso seco

Se ha sugerido que las variaciones registradas en las estimaciones de la relación RNA/DNA han sido debidas principalmente a la concentración de RNA. En este sentido se ha postulado, igualmente, que el contenido de DNA es más estable. De aquí surgió un índice basado en el contenido relativo de DNA (DNA/peso seco). En relación con esto, varios estudios en los que se ha empleado la relación RNA/DNA han reportado un aumento en el contenido de DNA (expresado como porcentaje del peso seco de la larva) de manera concomitante con un descenso en la relación RNA/DNA asociada a la inanición de las larvas. Esto parece ocurrir debido a que los animales no alimentados pierden peso mientras que el DNA es conservado. De aquí que una relación DNA/peso seco sea igualmente un indicador potencial de la condición nutricional de la larva. Esta aproximación tendría la ventaja adicional de obtener de manera más fácil y confiable valores de DNA que determinar DNA y RNA de manera simultánea.¹³ Sin embargo, la relación DNA/peso seco no permite la evaluación del potencial de crecimiento, y la habilidad de la larva para recuperarse de la inanición, contrariamente a la utilización de la relación RNA/DNA.¹⁴

La pérdida de peso se ha explicado en función de la movilización de las proteínas durante la inanición, lo que produce un aumento en espacio intercelular y en el contenido de agua lo que conlleva a una relación inversa entre el contenido de agua y el contenido de proteína en los músculos. De aquí que los peces en inanición puedan sobrevivir, aún cuando experimenten una degeneración considerable a nivel de las células del músculo. Sin embargo,

su flotabilidad cambia significativamente bajo estas condiciones. En las larvas de peces se observa, durante el intervalo entre la eclosión y el inicio de la alimentación exógena, un aumento en el contenido de agua y en la flotabilidad, de manera concomitante con el catabolismo de la proteína muscular.¹⁵

Relación RNA/longitud standard de la larva

Otros autores han propuesto índices basados en los residuales derivados de la regresión del contenido de RNA contra la longitud standard de la larva¹⁶, y aunque se ha demostrado que bajo ciertas condiciones este índice refleja, mejor que la relación RNA/DNA, los efectos de la alimentación de las larvas, la utilización de este descriptor implicaría que una simple regresión lineal asociaría el contenido de RNA a la longitud standard, lo cual no es obviamente el caso para el desarrollo de diferentes especies.

Relación DNA/contenido de carbono

Debido a la dificultad para pesar con precisión las larvas a nivel individual, se han propuesto otro tipo de índices basados en el contenido de carbono de las larvas, el cual es relacionado posteriormente con el contenido de DNA (DNA/C), en lugar de relacionar este contenido con el peso seco de los individuos.¹⁷

Ventajas de las técnicas basadas en ácidos nucleicos

No obstante que la relación RNA/DNA fue utilizada inicialmente sólo como un indicador de la condición nutricional de las larvas, posteriormente se observó que también resultaba un buen indicador del crecimiento de las mismas, ya que una buena condición nutricional es un prerequisite para un crecimiento exponencial sostenido.² A este respecto existen numerosos trabajos en los que se han establecido correlaciones significativas entre la relación de crecimiento, expresada como el aumento de la cantidad de proteína por unidad de tiempo, y la relación RNA/DNA de varias especies de moluscos, crustáceos, equinodermos, larvas y juveniles de peces.

Simplicidad en el procesamiento

Las técnicas basadas en la determinación de ácidos nucleicos requieren de un proceso mínimo antes de

llevar a cabo los análisis, en comparación con las técnicas histológicas y otras técnicas bioquímicas, ya que los ácidos nucleicos son moléculas relativamente robustas que pueden ser almacenadas en condiciones relativamente simples. A este propósito se ha reportado que pueden permanecer inalterados hasta por 24 horas en hielo.¹²

Sensibilidad

Otra ventaja es la sensibilidad, en especial la de los métodos fluorimétricos, que permiten determinaciones a nivel individual.² Sin embargo, debido a las propiedades de los colorantes fluorimétricos utilizados, la cantidad de RNA se calcula substrayendo el contenido de DNA del total de los ácidos nucleicos. En función de esto, cualquier error en el numerador de la relación RNA/DNA implicaría, al mismo tiempo, un error en el denominador, de tal manera que el error en la determinación de la relación RNA/DNA se vería magnificado.¹⁸ De aquí, que resulte imperativo tomar un máximo de precauciones durante todos los pasos del proceso analítico para llevar a cabo una determinación precisa.

Rapidez

Una de las particularidades inherentes a la determinación de la concentración de los ácidos nucleicos es la rapidez de su estimación, la cual puede ir desde algunas horas hasta un día, en función de la técnica utilizada.¹¹

Espectro

La determinación del contenido de los ácidos nucleicos ofrece la posibilidad de detectar diversos cambios fisiológicos en el organismo, independientes de la condición nutricional. Por ejemplo la relación RNA/DNA resulta sensible a cambios relacionados con situaciones patológicas, particularmente con aquellas relacionadas con la función digestiva.¹²

Se ha postulado que el método no sólo permite identificar cambios en la condición de las larvas durante el periodo crítico debidos a la transición entre la alimentación endógena (dependencia de las reservas de vitelo) a la exógena, sino también cambios relacionados con otra etapa crítica en las larvas de mayor tamaño y juveniles relacionados con la metamorfosis de éstas.^{14, 17}

Conclusiones

Esta revisión hace evidentes las ventajas teóricas y prácticas que ofrece la determinación de los ácidos nucleicos para lograr entender el metabolismo de las larvas de peces, por lo que actualmente la hemos adaptado para estimar la condición nutricional de éstas. Inicialmente, la selección y estandarización de la técnica fue llevada a cabo con larvas de pez dorado (*Carassius auratus*), ya que esta especie resulta un buen modelo por su facilidad para ser mantenida en condiciones experimentales. Sin embargo, el principal objetivo para su utilización ha estado dirigido hacia el estudio de peces nativos de importancia comercial, así como aquellos que presentan algún tipo de amenaza en sus poblaciones naturales, como es el caso del catán (*Atractosteus spatula*).^{19,20} Esto nos ha permitido determinar más fácil y rápidamente las condiciones físico-químicas óptimas de mantenimiento, así como los requerimientos nutricionales de la especie, con la finalidad de llevar a cabo la repoblación y el cultivo como principales estrategias para la conservación de estas especies.

Resumen

El estudio de la sobrevivencia de larvas de peces es un aspecto fundamental en el manejo de recursos pesqueros. Por lo cual resulta fundamental contar con índices que permitan determinar su condición nutricional y crecimiento. Generalmente, se han realizando evaluaciones morfológicas o histológicas. Sin embargo, ante la necesidad de contar con indicadores más sensibles y confiables, recientemente han emergido técnicas en las que se considera la concentración de ácidos nucleicos como principal elemento para determinar la condición de la larva. Este trabajo analiza el principio teórico de estas técnicas, así como otras variantes propuestas y las ventajas que ofrece su utilización.

Palabras clave: Relación RNA/DNA, índices de condición, larvas de peces.

Abstract

With the aim to understanding fish larval metabolism and nutritional condition that may reflect composite diets and natural feeding utilization, several techniques (i.e.

morphological, histological) have been used. However, the need for sensitive and reliable indicators of nutritional condition and growth has led to extensive research on biochemical indicators, particularly nucleic acids. The theoretical background of the most widespread techniques are analyzed, as well as different variations of these and the advantages of their utilization.

Keywords: RNA/DNA relationship, Condition indexes, Fish larvae.

Referencias

1. Ehrlich, K.F. Chemical changes during growth and -starvation of herring larvae. In: Blaxter, J.H. Eds. The early life history of fish. Springer-Verlag, Berlin, 1974, pp.301-323.
2. Clemmensen, C. Importance and limits of RNA/DNA ratios as a measure of nutritional condition in fish larvae. In: Watanabe Y., Yamashita Y. and Oozeki Y. Eds. Survival strategies in early life stages of marine resources., Proceedings of International Workshop, Yokohama, Japan, A.A. Balkema, Rotterdam, The Netherlands, 1996, pp. 67-82.
3. Elliott, J.K. and Legget, W.C. Larval condition and vulnerability to predation: an analysis based on mixed-prey experiments. J. Fish. Aquat. Sci., 1997, 55:626-630.
4. Rooker, J.K and Holt G.J. Application of RNA:DNA ratios to evaluate the condition and growth of larval and juvenile Red Drum (*Sciaenops ocellatus*). Mar. Freshwater Res., 1996, 47:283-290.
5. Yin, M.C. and Blaxter J.H. Feeding ability and survival during starvation of marine fish larvae reared in the laboratory. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 1987, 105:73-83.
6. Fuiman, L.A., Poling K.R. and Higgs U.M. Quantifying developmental progress for comparative studies of larval fishes. Copeia, 1998, 3:602-611.
7. Chung, K.S., Holt G.J. and Arnold C.R. Influencia de la privación de la dieta y realimentación sobre el crecimiento y la relación ARN-ADN en los juveniles del pez rojo *Sciaenops ocellatus*. Bol. Inst. Oceanogr., 1991, 29:336-344.
8. Chung, K.S., Nirchio M., Holt G.J. and Arnold C.R. Acidos nucléicos en la musculatura blanca y roja del pez rojo *Sciaenops ocellatus*. Bol. Inst. Oceanogr., 1988, 27 (1,2):123-127.

9. Westerman, M.E. and Holt G.J. The RNA-DNA ratios: measurement of nucleic acids in larval *Sciaenops ocellatus*. *Contributions to Marine Sciences Suppl.*, 1988, 30:117-124.
10. Mendoza, R., Aguilera C., Carreón L., Montemayor J., and González M. Early weaning of Alligátor gar *Atractosteus spatula* larvae. *Aquaculture America*, Book of abstracts, 2002, pp. 214.
11. Moss, S.M. Use of nucleic acids as indicators of growth in juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Marine Biology* 1994, 120:359-367.
12. Steinhart, M. and Eckmann R. Evaluating the nutrition of individual whitefish (*Coregonus spp.*) larvae by the RNA/DNA ratio. *J. Fish Biol.*, 1992, 40:791-799.
13. Bergeron, J.P., Boulhic M. and Galois K. Effet de la privation de nourriture sur la teneur en ADN de la larvae de sole (*Solea solea* L.). *ICES J. Mar. Sci.*, 1991, 43:127-134.
14. Ferron, A. and Leggett W.C. An appraisal of condition measures for marine fish larvae. *Adv. Mar. Biol.*, 1994, 30: 217-303.
15. Love, R.M. *The Chemical Biology of Fishes*. Vol 2. *Advances 1968-1977*. Academic Press New York, 1980.
16. Suthers, L.M., Jennifer J.C., Stephen C.V., and Racheel E. Relative RNA content as a measure of condition in larval and juvenile fish. *Mar. Freshwater Res.*, 1996, 47:301-307.
17. Bergeron, J.P., Person-Le and Koutsikopoulos C. Use of Carbon rather than dry weight to asses the DNA content and nutritional condition index of larvae. *J. Mar. Sci.*, 1997,54: 142-159.
18. Hovenkamp, F. and Witte J.I. Growth, otolith growth and RNA-DNA ratios of larval plaice *Pleuronectes platessa* in the north sea, 1987 to 1989. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1991, 70:105-116.
19. Mendoza, R., Aguilera C., Montemayor J., Rodríguez G. y Márquez G. *Biología de los lepisosteidos y estudios orientados hacia la recuperación de las poblaciones naturales del catán (Atractosteus spatula) (Lacépède, 1803)*. IV Reunión de Redes Nacionales de Investigación en Acuicultura. INP-SEMARNAP. P. Álvarez-Torres, 2000, pp. 103-120.
20. Mendoza, R., Aguilera C., Rodríguez G. y Márquez G. Estrategias para la domesticación de especies en acuicultura: El catán (*Atractosteus spatula*). In: V Reunión de Redes Nacionales de Investigación en Acuicultura Instituto Nacional de Pesca-SEMARNAP. Álvarez Torres, Ramírez-Flores, Torres-Rodríguez y Mora-Cervantes, 2001, 95-102.