

# Universidad Autónoma de Baja California

## Facultad de Ciencias Marinas



**“Expresión y actividad de enzimas digestivas durante el desarrollo del tracto digestivo de *Totoaba macdonaldi*, *Atractoscion nobilis* y *Lutjanus guttatus* bajo condiciones de cultivo”**

Que presenta

**Mario Alberto Galaviz Espinoza**

Tesis como requisito para obtener el grado de Doctor en Ciencias

Programa de Doctorado en Ciencias en Oceanografía Costera

Ensenada, Baja California. Agosto 2011

Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Ciencias Marinas

POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA

“Expresión y actividad de enzimas digestivas durante el desarrollo del tracto digestivo de *Totoaba macdonaldi*, *Atractoscion nobilis* y *Lutjanus guttatus* bajo condiciones de cultivo”

**TESIS**

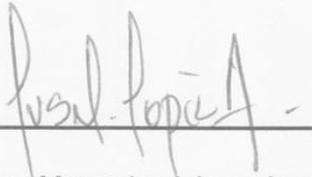
Que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFIA COSTERA**

PRESENTA

**MARIO ALBERTO GALAVIZ ESPINOZA**

APROBADA POR:



Dra. Lus Mercedes López Acuña

**Directora de tesis**



Dra. Ivone Giffard Mena

**Sinodal**



Dr. Rafael Hernández Walls

**Sinodal**



Dra. Silvia Alejandra García Gasca

**Co-Directora de tesis**



Dr. Eduardo Durazo Beltrán

**Sinodal**



Dr. Armando García Ortega

**Sinodal**

Ensenada, B.C. México a 6 de Septiembre de 2011

## **DEDICATORIA**

***A Dios quien es mi padre y que me ha guiado por el camino correcto durante toda mi vida***

***A mi esposa que tanto Amo y admiro por su valentía ante situaciones difíciles, te Amo Chiquilla hermosa.***

***A mis dos hermosos chaparros (Albertito y Mario) son mi motor para seguir adelante, los Amo con todo mi corazón mis hijos.***

***A mi mama que ha sido madre y padre durante toda mi vida y que desde niño me ha enseñado a nunca rendirme y luchar siempre por mis sueños y metas, Te Amo mama.***

***A mis hermanos (Marisol, Jesús, Miriam), a quien tanto amo, gracias hermanos por creer en mí.***

***A mis abuelos Gregoria y Rufino (QEPD), los extraño y sé que se sienten orgullosos de su nieto***

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la Universidad Autónoma de Baja California, a la Facultad de Ciencias de Marinas, por ser la facultad donde he cursado mis posgrados en Maestría y Doctor en Ciencias.**

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindarme la beca para realizar mis estudios de posgrado.**

**De manera muy especial a la Dra. Lus Mercedes López (Lucy) por su invaluable apoyo, consejos y dirección de este trabajo, en verdad Doctora Lucy muchas, pero muchas gracias por enseñarme a ser una persona responsable en mi vida y por todos aquellos momentos en que me brindo su más sincero apoyo y amistad, gracias por mostrarme el camino correcto para ser una persona dedicada en mi trabajo y sobre todo, que me ha enseñado a nunca rendirme.**

**A la Dra. Alejandra García-Gasca por su inigualable apoyo y dirección de este trabajo, gracias Dra, por su comprensión, paciencia, consejos y enseñanzas durante mis estudios de doctorado.**

**A mi comité doctoral, por el cual no hubiese podido realizar esta tesis. Dr. Eduardo Durazo, Dra. Ivonne Griffard, Dr. Rafael Walls y Dr. Armando García-Ortega, muchas gracias a todos ustedes por compartir conmigo sus experiencias, sabidurías y guiarme en este periodo de mi vida.**

**A todo el personal de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UABC-FCM) que me brindaron sus instalaciones y apoyo en este trabajo Gerardo, Iván, Miguel, Capitán, pero de manera muy en especial al Dr. Conal True, gracias por su amistad inigualable y por todos sus consejos y apoyo durante este trabajo.**

**Mario A. Galaviz. Agosto 2011**

**A todos mis profesores de la Facultad de Ciencias Marinas y del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (UABC) que me brindaron todos sus conocimientos durante mi estancia como estudiante.**

**A todas las personas que me ayudaron en todos los aspectos logísticos y técnicos de la presente tesis: Biol. Deyanira Rodarte, M.C. Yessica Solórzano, Ocean. Liliana Gaviño, Dr. Emmanuel Martínez, M.C. Isaura Bañuelos, M.C. Isabel Abdo, M.C, Estela Rodríguez, M.C. Ana Puello, M.C. Rubí Hernández, M.C. Itzetzl Sifuentes.**

**De manera muy especial quiero agradecer al Dr. Domenico Voltolina, Dr. Alfonso Álvarez González y Dr. Enric Gisbert, quienes me han ayudado en la redacción, procesamiento de datos e identificación de cortes histológicos en mi tesis doctoral, muchas gracias doctores por todos los consejos que me han brindado y sobre todo por su amistad.**

**A toda mi familia de la Brecha Guasave, Sinaloa, porque sé que siempre me han estado apoyando, a todos mis Tíos y primos: Pono, Prin, Nono, Víctor, Cuata, Gisela, Tere, Mocha, y de manera muy especial a mi Tía Chita y Chelino que se que siempre están deseando que me vaya bien, les agradezco muchas gracias por ser como padres para y sobre todo por considerarme un hijo más en su vida.**

**A todos aquellos que no los menciono, pero que siempre estuvieron conmigo.**

**A todos muchas gracias.**

## **ÍNDICE**

ÍNDICE-----	I
RESUMEN-----	VI
ABSTRACT-----	VIII
LISTA DE FIGURAS-----	X
LISTA DE TABLAS-----	XIV

## **CAPITULO 1**

1. Introducción-----	1
1.1. Enzimas digestivas-----	4
1.2. Fuente de proteasas-----	6
1.2.1. Proteasas vegetales-----	6
1.2.2. Proteasas animales-----	7
1.3. Ontogenia y fisiología del sistema digestivo en larvas de peces marinos-----	9
1.3.1. Boca, cavidad bucal y faringe-----	11
1.3.2. Esófago-----	11
1.3.3. Estómago-----	12
1.3.4. Intestino-----	12
1.3.5. Recto-----	13
1.3.6. Ciegos pilóricos-----	14
1.3.7. Páncreas, hígado y vesícula biliar-----	14
1.3.8. Regulación de las secreciones-----	15
1.4. Enzimas digestivas en larvas de peces marinos-----	15
1.5. Estudios sobre peces marinos en México-----	19

1.5.1. Totoaba ( <i>Totoaba macdonaldi</i> )	20
1.5.2. Corvina blanca ( <i>Atractoscion nobilis</i> )	23
1.5.3. Pargo lunarejo ( <i>Lutjanus guttatus</i> )	29
2.0. Antecedentes generales	32
2.1. Desarrollo del sistema digestivo	32
3.0. Justificación	39
4.0. Hipótesis	41
5.0. Objetivo general	41
5.1. Objetivos específicos	41

## **CAPITULO 2**

2.0. Totoaba ( <i>T. macdonaldi</i> )	43
2.1. Protocolo de cultivo larvario de totoaba ( <i>T. macdonaldi</i> )	44
2.1.1. Obtención de huevos y cultivo larvario	44
2.1.2. Recolecta de huevos de totoaba	45
2.1.3. Tanques de cultivo larvario	46
2.1.4. Alimentación	48
2.2. Colecta de muestras para análisis histológico, bioquímico y molecular	49
2.2.1. Preparación de extracto enzimático	50
2.2.2. Determinación de proteína soluble	52
2.2.3. Cuantificación de la actividad proteolítica	52
2.2.4. Calculo de actividades específicas	54
2.2.5. Análisis histológico	55
2.2.6. Análisis molecular	57

2.2.6.1. Clonación de genes de enzimas digestivas en larvas de totoaba-----	57
2.2.6.2. PCR cuantitativo (qPCR) -----	58
2.3. Análisis estadístico-----	59
2.4. Resultados-----	60
2.4.1. Crecimiento larvario-----	60
2.4.2. Desarrollo del sistema digestivo-----	61
2.4.3. Clonación y secuenciación parcial de las enzimas digestivas tripsina, pepsina y quimotripsina-----	65
2.5. Expresión y actividad de enzimas digestivas-----	67
2.5.1. Tripsina-----	67
2.5.2. Quimotripsina-----	70
2.5.3. Pepsina-----	72
2.6. Discusión-----	74

### **CAPITULO 3**

3.0. Corvina blanca ( <i>A. nobilis</i> ) -----	80
3.1. Protocolo de cultivo larvario de corvina blanca ( <i>A. nobilis</i> ) -----	81
3.1.1. Cultivo larvario-----	81
3.1.2. Alimentación-----	82
3.1.3. Colecta de muestras de larvas para análisis histológico y bioquímico-- -----	84
3.1.4. Determinación de proteína soluble-----	84
3.1.5. Cuantificación de la actividad proteolítica-----	84
3.1.6. Calculo de actividades específicas-----	86
3.2. Análisis histológico-----	86
3.3. Análisis estadístico-----	87
3.4. Resultados de corvina blanca-----	88

3.4.1. Crecimiento larvario-----	88
3.4.2. Desarrollo del sistema digestivo-----	89
3.4.3. Actividad enzimática-----	95
3.4.3.1. Tripsina-----	95
3.4.3.1. Quimotripsina-----	97
3.4.3.2. Leucina-Aminopeptidasa-----	99
3.4.3.3. Pepsina-----	101
3.4.3.4. $\alpha$ -Amilasa-----	103
3.5. Discusión-----	105

## **CAPITULO 4**

4.0. Pargo lunarejo ( <i>L. guttatus</i> ) -----	113
4.1. Protocolo de cultivo larvario de pargo lunajero-----	113
4.1.1. Obtención de huevos y cultivo larvario-----	113
4.1.2. Recolecta de huevos de pargo lunarejo-----	114
4.1.3. Tanques de cultivo larvario-----	114
4.1.4. Alimentación-----	116
4.1.5. Colecta de muestras para análisis histológico, bioquímico y molecular-----	117
4.2. Preparación de extractos enzimáticos-----	118
4.2.1. Determinación de proteína soluble-----	119
4.2.3. Cuantificación de la actividad proteolítica-----	119
4.2.4. Cálculo de actividades específicas-----	120
4.3. Análisis histológico-----	120
4.4. Análisis molecular-----	121
4.4.1. Clonación de genes de enzimas digestivas en larvas de pargo---	121
4.5. Análisis estadístico-----	121

4.6. Resultados de pargo lunarejo-----	121
4.6.1. Crecimiento larvario-----	121
4.6.2. Desarrollo del sistema digestivo y órganos asociados-----	122
4.6-3. Clonación y secuenciación parcial de las enzimas digestivas tripsina, quimotripsina y pepsina en larvas de pargo lunarejo-----	127
4.6.4. Expresión y actividad de enzimas digestivas-----	130
4.6.4.1. Tripsina-----	130
4.6.5.2. Quimotripsina-----	132
4.6.5.3. Pepsina-----	134
4.7. Discusión-----	136
5.0 Conclusiones-----	141
5.1. Totoaba-----	141
5.2. Corvina-----	141
5.3. Pargo-----	141
5.4. Bibliografía-----	146
5.5. Anexos-----	172

## **RESUMEN**

### **Expresión y actividad de enzimas digestivas durante el desarrollo del tracto digestivo de *Totoaba macdonaldi*, *Atractoscion nobilis* y *Lutjanus guttatus* bajo condiciones de cultivo**

El conocimiento de la fisiología digestiva en larvas de peces marinos es esencial para establecer protocolos de alimentación apropiados para cada etapa de cultivo, así mismo, para desarrollar dietas formuladas de acuerdo a la capacidad digestiva de las larvas en desarrollo. En el presente estudio, el sistema digestivo de totoaba, corvina blanca y pargo lunarejo fue caracterizado durante la ontogenia utilizando técnicas histológicas, bioquímicas y moleculares con el fin de entender la capacidad digestiva de estas especies.

En totoaba, la expresión y actividad de tripsina y quimiotripsina fueron observadas en el dpe 1, incrementando al inicio de la primera alimentación exógena y el desarrollo del tracto digestivo. Un incremento significativo en la expresión de pepsina fue detectado en el dpe 16, mientras que el incremento en el nivel de actividad fue detectado al dpe 24, coincidiendo con el desarrollo del estómago. Un segundo incremento en el nivel de expresión de pepsina fue detectado en el dpe 35, seguido por un pico de actividad en el dpe 40, coincidiendo con el cambio de alimento vivo a dieta formulada. Al momento de la eclosión, el sistema digestivo de totoaba fue indiferenciado. El ano y la boca fueron abiertos entre los dpe 4-5 respectivamente. Durante la alimentación exógena, una

diferenciación completa de todos los órganos digestivos fue observada incluyendo glándulas gástricas y estomago entre los dpe 24 y 28.

En larvas de corvina blanca el desarrollo del sistema digestivo fue similar a lo reportado en otras especies de larvas de peces marinos. Las larvas de corvina blanca al dpe 3 presentò todas las estructuras necesarias para la digestión y absorción de nutrientes como son proteínas y lípidos. En este momento, el desarrollo del sistema digestivo fue completamente diferenciado, lo cual le permite a la larva digerir el alimento formulado y absorber los nutrrientes a lo largo de las paredes del intestino. La mayoría de las actividades de enzimas digestivas fueron detectadas al momento de la eclosión. La actividad de tripsina fue detectada en el dpe 1, incrementando gradualmente durante los siguientes días, pero más notablemente después del inicio de la alimentación exógena en el dpe 4. La actividad específica de quimotripsina fue detectada en el dpe 1 y alcanzò el máximo nivel en el dpe 18. La actividad especifica de leucina aminopeptidasa incrementò continuamente desde el dpe 1 al dpe 18. La actividad de  $\alpha$ -amilasa fue detectada en el dpe 1 incrementandò al dpe 16. La actividad de pepsina fue detectada a un nivel muy bajo en el dpe 10, y un aumentò gradual en el nivel de actividad fue observado entre los dpe 16 y 18, alcanzando un máximo nivel en el dpe 40. Estos resultados indican que el desarrollo del tracto digestivo se diferencio rápidamente en esta especie y que el estòmago puede ser funcional entre los dpe 16-18. Por lo tanto, es probable realizar un cambio de alimentación de vivo a dieta formulada en peces de temprana edad.

En las larvas de pargo lunarejo la boca fue abierta entre los dpe 2 y 3, en este momento el tracto digestivo apenas pudo diferenciarse en intestino anterior y posterior, así mismo, el páncreas e hígado ya estaban presentes. Las glándulas gástricas fueron observadas hasta el dpe 20, seguido por la diferenciación del estómago entre los dpe 20 y 25. La expresión y actividad de tripsina fueron detectadas al momento de la eclosión, incrementando de acuerdo al desarrollo de la larva y al cambio en el tipo de alimento. El nivel máximo en la expresión de tripsina fue observado en el dpe 25, cuando las larvas fueron alimentadas con dieta artificial. Por otro lado, la expresión de pepsina fue detectada al dpe 18, dos días antes del inicio de la actividad enzimática y presencia de glándulas gástricas. El máximo nivel de pepsina fue observado en el dpe 35. Estos resultados sugieren que en larvas de pargo lunarejo el cambio de alimento de vivo a dieta artificial puede ser iniciado a una temprana edad comparado con el protocolo de alimentación actual.

## **ABSTRACT**

### **Expression and activity of digestive proteases during larval development of totoaba (*Totoaba macdonaldi*), white seabass (*Atractoscion nobilis*) and spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) under cultured conditions.**

The knowledge of the digestive physiology of fish larvae is essential to establish appropriate feeding and culture protocols in order to formulate diets according to the digestive capacity of the larvae in each stage of development. In the present study, the digestive systems of totoaba, white seabass, and spotted rose snapper were characterized during ontogeny using histological, biochemical and molecular techniques to understand the digestive capacity of these species.

In totoaba the expression and activity of trypsin and chymotrypsin were observed from dph 1, and higher values coincided with changes in exogenous feeding and digestive tract development. A peak in pepsin expression was detected at 16 dph, whereas the peak of activity was detected at day 24, coinciding with the development of the stomach. A second peak of pepsin expression was detected at day 35, followed by a peak of activity at day 40, coinciding with the change from live to formulated diet. At hatch, the digestive system of totoaba was undifferentiated. The anus and the mouth opened at 4 and 5 dph, respectively. During the exogenous feeding, a complete differentiation of all digestive organs was observed including gastric glands and stomach between 24 and 28 dph.

In white seabass the development of the digestive system of the larvae was similar to that reported for other marine fish species. Larvae at 3 dph presented all the structures necessary for the digestion and absorption of nutrients such as proteins and lipids. At this time, the digestive system was fully developed allowing them to digest inert food and to absorb nutrients throughout the intestine walls. Most digestive enzyme activities were detected at the time of hatch. Trypsin activity was detected at 1 dph and increased gradually during the following days, but most notably after the initial exogenous feeding at 4 dph. The specific activity of chymotrypsin was detected at 1 dph and reached the maximum level at 18 dph. The specific activity of leucine aminopeptidase increased continuously from 1 dph to 18 dph. The activity of  $\alpha$ -amylase was detected at 1 dph increasing at 16 dph. The activity of pepsin was detected at a very low level at 10 dph, and a stepwise increase in activity was observed between 16 and 20 dph, reaching maximum level at 40 dph. These results indicate that the digestive tract develops rapidly in this

species and that the stomach becomes functional between 16 and 18 dph. It should, therefore, be possible to start weaning the fish at this young age.

The larvae of spotted rose snapper opened the mouth between 2 and 3 dph, at that moment the digestive tract was barely differentiated into the anterior and posterior intestine, although the liver and pancreas were already present. Gastric glands were observed until 20 dph, followed by the differentiation of the stomach between 20 and 25 dph. Trypsin expression and activity were detected at hatching, increasing concomitantly to larval development and the change in the type of diet. Maximum levels of trypsin expression were observed at 25 dph, when animals were fed with *Artemia* nauplii, and maximum activity was detected at 35 dph, when larvae were fed with an artificial diet. On the other hand, pepsin gene expression was detected at 18 dph, two days before enzymatic activity starts and appearance of gastric glands. Maximum pepsin activity was also observed at 35 dph. These results suggest that in spotted rose snapper larvae weaning could be initiated at an earlier age than is currently practiced (between 28 and 30 dph), since larvae of develop a functional stomach between days 20 and 25 post-hatch.

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>Figura 1.</b> Tendencia de la producción acuícola; principales especies	<b>2</b>
<b>Figura 2.</b> Reproductores de <i>T. macdonaldi</i> en las instalaciones de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura, Facultad de Cien (UBP)	<b>23</b>
<b>Figura 3.</b> Desarrollo larvario de corvina blanca. Larva con saco vitelino, 2.8 mm, 3.7mm; larva en estadio de preflexión, 3.7 mm; larva en estadio de flexión 6.5 mm	<b>26</b>
<b>Figura 4.</b> Juveniles de <i>L. guttatus</i> cultivados en instalaciones del CIAD Unidad-Mazatlán	<b>31</b>
<b>Figura 5.</b> Tanques de cultivo larvario utilizados durante el desarrollo experimental de totoaba	<b>47</b>
<b>Figura 6.</b> Protocolo de alimentación y toma de muestras durante el larvicultivo de totoaba ( <i>T. macdonaldi</i> ). (ab), abertura de la boca, (est), estómago, (gg), glándulas gástricas, (sv), absorción del saco vitelino	<b>49</b>
<b>Figura 7.</b> Procedimiento utilizado para la obtención del extracto enzimático en larvas de totoaba, corvina y pargo lunarejo	<b>51</b>
<b>Figura 8.</b> Procedimiento histológico utilizado para la realización del desarrollo del sistema digestivo en larvas de totoaba, corvina y pargo lunarejo	<b>56</b>
<b>Figura 9.</b> Longitud y peso de grupo de larvas de totoaba (cm, mg larva $\pm$ D.E., n=3). Con flechas se indica el tipo de alimento que se proporciono durante ese periodo	<b>60</b>
<b>Figura 10.</b> Secciones sagitales de larvas de totoaba. (A) dpe 1, (B) dpe 3, (C) dpe4 y (D) dpe 12. Abreviaciones. (b) boca, (bc) bucofaringe, (c) corazón, (e) esófago, (fm) fibras musculares, (ga) gota de aceite, (h) hígado, (ia) intestino anterior, (im) medio, (ip) posterior, (n) notocordio, (pe) páncreas exocrino, (r) recto, (sv) saco vitelino, (V) vejiga	<b>62</b>
<b>Figura 11.</b> Secciones sagitales del sistema digestivo de larvas de totoaba (A) dpe 18, (B) dpe 24, (C) dpe 28, (D) acercamiento del estómago donde se observan las glándulas gástricas (gg) indicadas por flechas en en la Figura D. (e), esofago, (est), estómago, (h) hígado, (ia) intestino anterior, (im) intestino medio, (ip) intestino posterior, (pe), páncreas, (v), vejiga gaseosa	<b>63</b>

- Figura 12.** Secciones sagitales del sistema digestivo de larvas de totoaba. **64**  
(A) dpe 32, (B) acercamiento del esófago donde se observan células caliciformes (cc), (C) dpe 36 se observan ciegos pilóricos (cp) y dpe 40, (D) acercamiento de los ciegos pilóricos (cp) y vacuolas lipídicas (vl) en el hígado (vl). Las flechas en la Figura B indican células caliciformes, en la Figuras C y D indican glándulas gástricas y ciegos pilóricos respectivamente, (cc), celuelas caliciformes, (cp), ciegos pilóricos, (e), Esofago, (est), estómago, (gg), glándulas gástricas, (h) hígado, (ia) intestino anterior, (im) intestino medio, (ip) intestino posterior, posterior, (pe), páncreas exocrino, (v), vejiga gaseosa
- Figura 13.** Expresión y actividad de tripsina en larvas de totoaba durante su desarrollo larvario (Media  $\pm$  DE, n=3). Asteriscos (\*) indican diferencias significativas en el tiempo **69**
- Figura 14.** Expresión y actividad de quimotripsina en larvas de totoaba durante su desarrollo larvario (Media  $\pm$ DE n=3). \* indican diferencias significativas en el tiempo **71**
- Figura 15.** Expresión y actividad de pepsina en larvas de totoaba durante su desarrollo larvario (Media  $\pm$ DE n=3). \* Indican diferencias significativas en el tiempo **73**
- Figura 16.** Protocolo de alimentación y toma de muestras durante el larvicultivo de corvina blanca (*A. nobilis*). Se indican los principales eventos que tuvieron lugar durante el desarrollo: ab: apertura de la boca; sv, absorción del saco vitelino; gg, aparición de glándulas gástricas; est, diferenciación del estomago funcional **83**
- Figura 17.** Longitud y peso del grupo de larvas de corvina blanca (cm, mg larva  $\pm$  DE. n=3) **89**
- Figura 18.** Secciones sagitales de larvas de corvina blanca. (A) dpe 1, (B) dpe 3, (C) dpe 8 y (D) dpe 12. (b) boca, (br) branquias, (bc) bucofaringe, (c) corazón, (db) ducto biliar, (du) ducto urinario(e) esófago, (ga) gota de aceite, (h) hígado, (la) intestino anterior, (im) intestino medio, (ip) intestino posterior, (n) notocordio, (pe) páncreas exocrino, (rc) riñón cefálico (sv) saco vitelino, (V) vejiga **91**
- Figura 19.** Secciones sagitales del sistema digestivo de larvas de corvina blanca. (A) dpe 16, (B) dpe 18, (C) dpe 20. (b) boca, (br) branquias, (bc) bucofaringe, (c) corazón, (db) ducto biliar, (du) ducto urinario (e) esófago, (est) estomago, (gg) glándulas gastricas, (h) hígado, (la) intestino anterior, (im) intestino medio, (ip) intestino posterior, (n) notocordio, (ojo) ojo, (pe) páncreas exocrino, (rc) riñón cefálico, (V) vejiga **93**

- Figura 20.** Secciones sagitales del sistema digestivo de larvas de corvina blanca. (A) dpe 24, (B) dpe 32, (C) dpe 40. (b) boca, (br) branquias, (bc) bucofaringe, (c) corazón, (cp) ciegos pilóricos, (du) ducto urinario, (e) esófago, (est) estomago, (gg) glándulas gástricas, (h) hígado, (Ia) intestino anterior, (im) intestino medio, (ip) intestino posterior, (n) notocordio, (ojo) ojo, (pe) páncreas exocrino, (rc) riñón cefálico, (V) vejiga, (ver) vertebra **94**
- Figura 21.** Actividad específica y total de tripsina en larvas de corvina blanca durante su desarrollo larvario (Media  $\pm$ D.E n=3). (\*) Indican diferencias significativas en el tiempo **96**
- Figura 22.** Actividad específica y total de quimotripsina en larvas de corvina blanca durante su desarrollo larvario (Media  $\pm$ DE n=3). (\*) indican diferencias significativas en el tiempo **98**
- Figura 23.** Actividad específica y total de leucine-aminopeptidasa en larvas de corvina blanca durante su desarrollo larvario (Media  $\pm$ DE n=3). (\*) indican diferencias significativas en el tiempo **100**
- Figura 24.** Actividad específica y total de pepsina en larvas de corvina blanca durante su desarrollo larvario (Media  $\pm$ D.E n=3). (\*) indican diferencias significativas en el tiempo **102**
- Figura 25.** Actividad específica y total de  $\alpha$ -Amilasa en larvas de corvina blanca durante su desarrollo larvario (Media  $\pm$ D.E n=3). (\*) indican diferencias significativas **104**
- Figura 26.** Sistema de tanques de fibra de vidrio utilizados durante el desarrollo del cultivo experimental de pargo lunarejo en las instalaciones del CIAD Unidad-Mazatlán **115**
- Figura 27.** Protocolo de alimentación y toma de muestras durante el larvicultivo del pargo lunarejo (*L. guttatus*). Se indican los principales eventos que tuvieron lugar durante el desarrollo. ab: apertura de la boca; sv, absorción del saco vitelino; gg, aparición de glándulas gástricas; est, diferenciación del estómago funcional **117**
- Figura 28.** Longitud y peso del grupo de larvas de pargo (cm, mg/ larva  $\pm$  DE, n=3) **122**
- Figura 29.** Sección sagital de larvas de pargo lunarejo. (A) larvas 1 dpe, (B) larvas dpe 3. b, boca; ga, gota de aceite; ia, intestino anterior; ip, intestino posterior; n, notocordio; ojo; sv, saco vitelino, td, tubo digestivo. Tinción hematoxilina & eosina **123**
- Figura 30.** Secciones sagitales en larvas de pargo lunarejo. (A) larvas dpe 10, (B) larvas dpe 18, (C) y (D) larvas dpe 20. b, boca; bc, bucofaringe; e, esófago; est, estómago; gg, glándulas gástricas; h, hígado; ia, intestino **126**

anterior; ip, intestino posterior; ojo; pe, páncreas exocrino; r, recto; ver, vertebra; vn, vejiga natatoria Flechas indican gg. Tinción hematoxilina & eosina

**Figura 31.** Sección sagital de larvas de pargo lunarejo. (A) larvas dpe 25, (B) larvas dpe 30 y (C) larvas dpe 40. Abreviaciones: al, alimento; b, boca, bc, bucofaríngeo; cp, ciegos pilóricos; du, ducto urinario; e, esófago; est, estómago; h, hígado; ia, intestino anterior; ip, intestino posterior; vl, vacuolas lipídicas; vn, vejiga natatoria. Flechas indican vl. Tinción hematoxilina & eosina **127**

**Figura 32.** Expresión y actividad de tripsina durante el desarrollo larvario del pargo lunarejo (Media  $\pm$  DE, n=3). Asteriscos (\*) indican diferencias significativas en el tiempo **131**

**Figura 33.** Expresión y actividad de quimotripsina en larvas de pargo lunarejo durante su desarrollo larvario (Media  $\pm$ DE n=3). (\*) Indican diferencias significativas en el tiempo **133**

**Figura 34.** Expresión y actividad de pepsina en larvas de pargo lunarejo durante su desarrollo larvario (Media  $\pm$ DE n=3). (\*) Indican diferencias significativas en el tiempo **135**

**Figura 35.** Comparación de los estadios de desarrollo en el tracto digestivo de varias especies de peces. AP: actividad proteasa alcalina (tripsina y quimotripsina); AB: apertura de boca; AV: absorción de vitelo; EF: estómago funcional **144**

<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>Tabla I.</b> Clasificación de las proteasas por familias	<b>5</b>
<b>Tabla II.</b> Sustratos utilizados para cuantificar espectrofotométricamente la actividad de diferentes enzimas digestivas en larvas de totoaba, corvina y pargo	<b>55</b>
<b>Tabla III.</b> Secuencias nucleotídicas parciales de enzimas digestivas obtenidas de larvas de totoaba	<b>65</b>
<b>Tabla IV.</b> Primers específicos para los genes (tripsina, quimotripsina, pepsina y 18s ribosomal) de totoaba	<b>67</b>
<b>Tabla V.</b> Secuencias nucleotídicas parciales de enzimas digestivas obtenidas en larvas de pargo lunarejo	<b>128</b>
<b>Tabla VI.</b> Primers específicos diseñados para amplificar tripsina, quimotripsina, pepsina y 18s rRNA en larvas de pargo lunarejo	<b>129</b>
<b>Tabla VII.</b> Oligos degenerados utilizados en la búsqueda de oligos específicos para las especies en estudio	<b>190</b>
<b>Tabla VIII.</b> Secuencias nucleotídicas parciales de enzimas digestivas obtenidas de larvas de totoaba y corvina no registradas en GenBank	<b>199</b>

# **CAPITULO 1**

## **1. Introducción**

La alta explotación pesquera de peces de importancia comercial ha originado el uso y expansión de la acuicultura como una alternativa de producción.

La acuicultura es un sector productivo de alimentos ricos en proteínas de alta calidad con un gran potencial de crecimiento y, según la información proporcionada por la FAO (2010), la producción acuícola mundial de pescado y marisco comestible, incluidos los peces de aleta, los crustáceos, los moluscos y otros animales acuáticos destinados al consumo, alcanzó los 52.5 millones de toneladas en 2008. La contribución de la acuicultura a la producción total ha presentando un aumento continuo de tal manera que en el 2008 llegó a ser el 36.9 % producto de pescado y mariscos. En el período 1970-2008 la producción acuícola de peces comestibles aumentó a un ritmo anual medio del 8.3 %, mientras que la población mundial aumentó en promedio un 1.6 % anual (Figura 1).

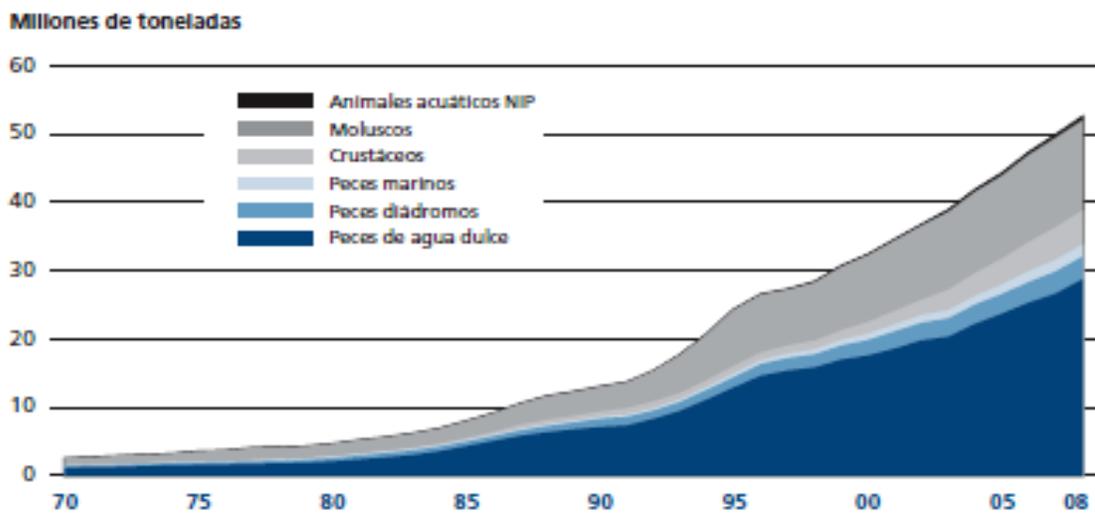


Figura 1. Tendencia de la producción acuícola; principales especies (FAO 2010).

La acuicultura en la actualidad constituye una de las actividades económicas más fértiles y prometedoras. Según los reportes de la FAO (2010), la acuicultura a nivel mundial ha crecido más rápido que otros sectores de producción de alimento, con un suministro acuícola per cápita de 0.7 kg en 1970 y hasta 7.8 kg en 2008, lo que constituye un crecimiento anual del 6.6%, lo cual se espera que en un futuro supere a la pesca de captura como fuente de alimento de buena calidad (FAO, 2010).

La producción de peces por área de estanque o por unidad de cultivo, y por tanto la rentabilidad de la cría de peces, depende en gran medida de la cantidad y calidad de alimento proporcionado. Mientras más intensivo sea el sistema de cultivo, mayor será la importancia de la alimentación (Hepher, 1988). La obtención y cría en masa de grandes cantidades de larvas de peces marinos es el paso previo para la puesta en cultivo a una escala comercial. Los esfuerzos de investigación se han dirigido a determinar las condiciones que incrementen la supervivencia y crecimiento de las larvas; estos esfuerzos incluyen estudios de fisiología digestiva con el objeto de planificar mejor las estrategias de alimentación.

Los estudios enfocados en incrementar la supervivencia y crecimiento de las larvas son importantes. Se ha comprobado que el nivel de actividad de algunas enzimas digestivas puede ser un buen indicador del estado nutricional, la presencia de ciertas enzimas es relevantes para establecer el momento óptimo de destete (Uebershar, 1993) o bien para evaluar el estado general del cultivo.

En la acuicultura de peces marinos, uno de los puntos más importantes es la alimentación, especialmente en la etapa larvaria, ya que los cambios anatómicos y fisiológicos durante el desarrollo de las larvas de peces serán los factores que definen sus requerimientos nutricionales. Una vez que el saco vitelino es absorbido, en el medio natural los peces toman su alimento del plancton (alimento vivo) como dieta inicial. Considerando que el mayor constituyente nutricional del alimento vivo es la proteína, la capacidad proteolítica para la digestión del bolo alimenticio puede ser considerada como la más importante en los estudios nutricionales con larvas de peces (García-Ortega, 2000).

### **1.1. Enzimas digestivas**

#### **Generalidades:**

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores biológicos que incrementan la velocidad de una reacción, sin que ellas mismas se vean alteradas en el proceso global. Las enzimas han sido clasificadas por la Comisión de Enzimas (EC) de la Unión Internacional de Bioquímica en seis grandes grupos (Lehninger *et al.*, 1984):

1. **Óxido reductasas:** catalizan reacciones de oxidación-reducción.
2. **Transferasas:** catalizan transferencias de grupos funcionales de una molécula a otra.
3. **Hidrolasas:** catalizan rupturas hidrolíticas.

4. **Liasas:** catalizan eliminaciones de un grupo o adicionan un grupo a un doble enlace, u otras rupturas que impliquen un reordenamiento electrónico.
5. **Isomerasas:** catalizan reordenamientos intramoleculares.
6. **Ligasas:** catalizan reacciones en las que se unen dos moléculas.

Las proteasas, también conocidas como peptidasas, son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos que forman la estructura primaria de las proteínas y están presentes en la mayoría de los organismos (Lehninger *et al.*, 1984).

De acuerdo a su secuencia aminoacídica, las proteasas se agrupan en seis familias (Tabla 1), que amplían las clases antes mencionadas. Su clasificación basa en el porcentaje de similitud de su secuencia de aminoácidos y cuya relación puede ser demostrada desde un punto de vista evolutivo. De esta forma es posible diferenciar entre serina-proteasas de mamíferos (tripsina, quimotripsina o elastasa) y las de origen bacteriano (subtilisina) (Dumermuth *et al.*, 1991).

**Tabla 1.** Clasificación de las proteasas por familias (tomada de Alarcón, 1997).

<b>Clase</b>	<b>Enzima</b>	<b>Origen</b>
<i>Serina I</i>	tripsina	páncreas
	quimiotripsina	páncreas
<i>Serina II</i>	subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Cisteína</i>	papaína	<i>Papaya latex</i>
	quimopapaína	<i>Papaya latex</i>
	ficina	<i>Ficus latex</i>
	bromelaína	<i>Ananas comosus</i>

	catepsina B	varios tejidos
<i>Acidas</i>	pepsina	jugo gástrico
	quimosina	Jugo gástrico (ind. Jóvenes)
	catepsina D	Hígado, bazo
<i>Metal I</i>	carboxipeptidasa A	Páncreas de bovino
<i>Metal II</i>	termolisina	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>

Las proteasas también se pueden subdividir en dos subgrupos de acuerdo a las exopeptidasas, que son las enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos entre aminoácidos terminales (extremo amino o carboxilo de la proteína) y las endopeptidasas, que hidrolizan los enlaces peptídicos internos.

Un ejemplo de una endopeptidasa es la tripsina que es una enzima digestiva perteneciente a las endopeptidasas, ya que rompe los enlaces peptídicos de las proteínas mediante hidrólisis para formar péptidos o aminoácidos de menor tamaño (Lehninger *et al.*, 1984).

## **1.2. Fuente de proteasas**

Las proteasas son fisiológicamente necesarias para todo ser vivo se obtienen de una amplia diversidad de fuentes tales como plantas, animales y microorganismos.

### **1.2.1. Proteasas vegetales:**

El uso de plantas como fuente de proteasas son conducidas por varios factores tales como la disponibilidad de tierras para el cultivo y la adecuación de las condiciones climáticas para el crecimiento. Así mismo, la producción de proteasas de plantas es un proceso que consume tiempo. Entre las proteasas

vegetales más conocidas se encuentran la papaína, bromelaina, keratinasas y ficina.

### **1.2.2. Proteasas animales:**

Las proteasas de origen animal más comunes y estudiadas son la tripsina pancreática, la quimotripsina y la pepsina. Éstas se preparan en forma pura en grandes cantidades (Boyer, 1971).

- **Tripsina.** La tripsina (EC 3.4.21.4) es la principal enzima digestiva intestinal responsable de la hidrólisis de proteína de los alimentos. Es una serina proteasa pancreática que hidroliza los enlaces peptídicos constituidos por lisina y arginina. La enzima se sintetiza como un zimógeno inactivo llamado tripsinógeno que es activado en la luz del intestino por la enteroquinasa presente en la membrana de los enterocitos (Huber y Bode, 1978), la cual a su vez, es la encargada de activar el resto de zimógenos pancreáticos, por ejemplo: quimotripsinógeno, procarboxipeptidasa A y B y proelastasa, entre otros. El pH óptimo en que trabaja esta enzima es de 8.0 (Hartley et al., 1972).
- **Quimotripsina.** La quimotripsina (EC 3.4.21.1) es una proteasa serina capaz de hidrolizar enlaces peptídicos cuando el residuo 1 contiene tirosina, fenilalanina o triptófano, así mismo, actúa sobre amidas y ésteres. Se almacena en el páncreas en forma de un precursor, quimotripsinógeno, y es activado por la tripsina (Whitaker, 1994).

- **Pepsina.** La pepsina (EC 3.4.23.1) es una proteasa ácida que se encuentra en el estómago de la mayoría de los vertebrados. Esta enzima es secretada en su forma de zimógeno, por las células principales de la mucosa gástrica. El pepsinógeno se convierte en pepsina activa por acción de la propia enzima, al pH ácido del jugo gástrico. La pepsina posee una especificidad muy amplia, pero ataca preferentemente a los enlaces peptídicos en los que intervienen restos de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), así como metionina y leucina. La pepsina es una aspartil proteasa que tiene su máxima actividad a pH de 1-2. El óptimo pH del estómago es de 2 a 4. La pepsina se inactiva por encima de pH 6.0. (Squires *et al.*, 1986).
- **Catepsinas.** Las catepsinas son enzimas relacionadas con los procesos de digestión intracelular. Dentro de este grupo existen varios tipos (B, C, D, G y L) con diferentes mecanismos de acción. Presentan un óptimo de actividad a pH entre 4-5 (Lee *et al.*, 1993).
- **Quimosina o Renina.** La quimosina o renina (EC 3.4.23.4) es una proteasa similar a la pepsina, que es producida en forma de precursor inactivo, pro-rennina, en el estómago de los mamíferos. Se convierte a renina activa por la acción de la pepsina (Rao *et al.*, 1998).

**Las exoproteasas que más destacan son:**

- **Aminopeptidasas.** Las aminopeptidasas (EC 3.4.11) catalizan la hidrólisis de los restos aminoacídicos, concretamente desde el extremo amino de un péptido. Se clasifican en función de los requerimientos de iones metálicos ( $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  o  $Co^{2+}$ ) y la especificidad por determinados dipéptidos (Behal *et al.*, 1965). Entre sus diversas funciones destacan: la maduración de proteínas, degradación terminal de proteínas, regulación hormonal y control del ciclo celular. En el caso concreto de la leucina-aminopeptidasa, se ha relacionado su nivel de actividad en la membrana de los enterocitos con el estado nutricional de los organismos en estados iniciales.
- **Carboxipeptidasas.** Las Carboxipeptidasas son exoproteasas que liberan residuos aminoacídicos del extremo carboxiterminal de los péptidos y proteínas. Se conocen dos familias de carboxipeptidasas: las serina carboxipeptidasas (EC 3.4.16), que contienen un residuo de serina en su centro activo y las metalo carboxipeptidasas (EC 3.4.17) que requieren de iones  $Zn^{2+}$  para ser activas (Hayashi, 1976 y Hajjou *et al.*, 1995).

**1.3. Ontogenia y fisiología del sistema digestivo en larvas de peces marinos**

Las larvas de peces son las formas funcionales e independientes más pequeñas entre los vertebrados; poseen tasas de crecimiento muy elevadas y una diferenciación progresiva durante la etapa larvaria hasta completar el desarrollo de sus órganos y funciones en las fases juvenil y adulta (Blaxter, 1988). Para realizar

con eficiencia todos estos cambios, las larvas deben estar capacitadas para ingerir (acción que implica buscar y capturar) y utilizar (digerir, absorber y metabolizar) el alimento. No obstante, en la mayoría de las especies el sistema digestivo de las larvas es morfológica, histológica y fisiológicamente menos desarrollado que el de los adultos (Govoni *et al.*, 1986).

Para efectos prácticos, Dabrowski (1982) estableció tres categorías de peces considerando los principales eventos que ocurren durante la evolución y desarrollo de su sistema digestivo. En un primer grupo, consideró a los salmónidos y algunos cíclidos, que al inicio de la alimentación exógena presentan ya un estómago bien desarrollado y además funcional. Un desarrollo de este tipo determina que se puede iniciar la alimentación de estas especies directamente con dieta inerte al momento de abrir la boca. En el segundo grupo, se engloban la mayoría de los peces marinos, en los cuales el estómago aparece después de iniciar la alimentación exógena, existiendo en algunas especies hasta cierto desfase entre su aparición y funcionalidad (Lauff y Hoffer, 1984). En el tercer grupo, se incluyen los peces que permanecen sin estómago a lo largo de toda su vida, como son los ciprínidos, siendo lo más común durante su desarrollo larvario el incremento notable de la longitud del intestino.

En la mayoría de las larvas de peces marinos recién eclosionadas, el tracto digestivo es un tubo recto sin diferencias histológicas que descansa dorsalmente sobre la vesícula vitelina, el cual está cerrado por ambos extremos (boca y ano),

hasta después de la absorción de las reservas vitelinas diferencian las regiones del sistema digestivo histológicamente y funcionalmente (Govoni, 1980).

La ontogenia del sistema digestivo de las larvas de peces marinos ha sido objeto de numerosos estudios en las dos últimas décadas. Más allá del interés científico, diversas investigaciones se han enfocado en elucidar cómo satisfacer las necesidades de crianza de larvas de peces marinos en cantidades importantes ya que se considera que esta etapa de desarrollo es la más vulnerable (cuello de botella) en el cultivo de peces marinos. El tubo o tracto digestivo se puede dividir en boca, cavidad bucal, esófago, estómago (ausente en peces agástricos), intestino (anterior y posterior) y recto, e incluye las distintas válvulas y esfínteres musculares que controlan el flujo del alimento (Alarcón, 1997).

### **1.3.1. Boca, cavidad bucal y faringe**

Estas estructuras están asociadas con la predigestión del alimento (selección, orientación y deglución). Al contrario de los peces carnívoros, los peces agástricos carecen de dientes en sus mandíbulas y cuando están presentes sólo participan en la captura del alimento y manejo de la presa. En algunos ciprínidos, que carecen de estómago, la presencia de dientes faríngeos que disgregan parcialmente el alimento ayudan al proceso digestivo intestinal (Hickling, 1966). La lengua normalmente es un órgano poco desarrollado, excepto en los peces carnívoros, que contribuye a la retención de las presas y como órgano sensorial.

### **1.3.2. Esófago**

El esófago, corto y extensible, no está claramente separado del estómago (a través del cardias) o en su caso del intestino. Su función esencial, en la nutrición es la de lubricar el alimento que pasa al estómago o intestino. Además, algunos autores han descrito la presencia de glándulas que secretan enzimas proteolíticas (pepsinógeno) en la mucosa del esófago (Kapoor *et al.*, 1975; Anderson, 1991). En la mayoría de los peces, el conducto aéreo de la vejiga natatoria (*Ductus pneumaticus*) desemboca en este segmento del sistema digestivo.

### **1.3.3. Estómago**

No todos los peces poseen estómago e incluso dentro de la misma familia puede haber especies en las que éste órgano esté ausente. Al igual que los vertebrados superiores, el estómago de los peces posee la misma organización tisular desde la cavidad peritoneal hasta la luz estomacal (serosa-muscular-mucosa). Se puede dividir en dos regiones: la anterior y la pilórica. En la primera se localizan la mayoría de las células gástricas, que en el caso de los teleósteos secretan tanto HCl como pepsinógeno. La zona pilórica suele contribuir al triturado y mezcla del alimento antes de pasar al intestino a través del esfínter pilórico. En algunos peces el estómago es un órgano muy extensible. Así, la ingestión abundante de alimento puede provocar en la trucha arcoíris una dilatación del estómago del 30-35% en longitud y del 75% en diámetro (Alarcon, 1997; Guillaume *et al.*, 2001 y Zambonino-Infante *et al.*, 2008)

#### **1.3.4. Intestino**

El intestino de los peces está formado por un epitelio columnar simple de células de ribete en cepillo, que es característico de tejidos capaces de absorber (Krementz y Chapman, 1975). El borde de ribete en cepillo de estas células juega un papel importante en el proceso digestivo, ya que incrementa la superficie de contacto de las células intestinales con los nutrientes, aumentando la superficie de digestión y absorción en comparación con un epitelio liso. Al contrario que la longitud intestinal, la superficie intestinal relativa ( $\text{cm}^2$ ) disminuye a medida que el pez crece (Steffens, 1989). En la mayoría de los peces se distinguen dos regiones intestinales diferenciadas teniendo en cuenta su función:

1. La región anterior, zona que recibe las secreciones pancreáticas y biliares, está caracterizada por la presencia de gran cantidad de quilomicrones (inclusiones lipídicas) en sus células epiteliales.
2. La región posterior, caracterizada por una elevada actividad pinocitótica de sus células epiteliales y la presencia de gránulos intracelulares con macromoléculas protéicas (Boge y Peres, 1983).

#### **1.3.5. Recto**

La parte terminal del intestino está normalmente diferenciada en un verdadero recto, la cual está demarcada por la válvula ileorectal (Anderson, 1986), pero en algunas especies no está presente y es sustituida por un ligero adelgazamiento del intestino ocasionado por un anillo muscular (Mohsin, 1962).

En el epitelio rectal tiene lugar la absorción de agua, iones y algunas proteínas (Bullock, 1967, Mena *et al.*, 2008)

### **1.3.6. Ciegos pilóricos**

Algunas especies de peces poseen como formación especial del intestino inmediatamente por detrás del píloro, unos apéndices o sacos ciegos denominados ciegos pilóricos, que se consideran dilataciones del intestino ya que histológicamente son similares, pero careciendo de células que secretan enzimas digestivas (Vegas-Velez, 1972). La presencia, ausencia y número de ciegos pilóricos (de 1 a 1000) varía entre especies y con el régimen alimenticio. Algunos autores han correlacionado la capacidad digestiva con el número de apéndices pilóricos (De La Noue, 1989). Entre las funciones relacionadas con los ciegos pilóricos destacan: suplementar la función digestiva del estómago, incrementar la superficie intestinal (puede llegar a ser más del doble que la del intestino) y actuar como reservorio de alimento y lugar de absorción de carbohidratos, grasas, iones inorgánicos y agua (Aoki *et al.*, 2003).

### **1.3.7. Páncreas, hígado y vesícula biliar**

Con la excepción de pocas especies, como el siluro (*Parasilurus asotus*) (Yoshinaka *et al.*, 1984), la mayoría de los teleósteos, al contrario que los vertebrados superiores, poseen un páncreas difuso (Fange y Grove, 1979). En los individuos adultos generalmente está muy ramificado y se localiza a lo largo de la vena porta hepática, así como en las venas que recorren la superficie del estómago, ciegos pilóricos, intestino y bazo (Kurokawa y Suzukil, 1996). El jugo

pancreático, cargado de precursores enzimáticos, se descarga a nivel de los ciegos pilóricos por el esfínter de Oddi a través del *ductus pancreaticus*, asociado en algunos peces con el *ductus choleducus* (jugos biliares) (Bishop y Odense, 1966).

El hígado se localiza en la parte anterior de la cavidad abdominal, recibiendo sangre de la arteria hepática y de la vena porta que irriga la mucosa gástrica e intestinal. En la mayoría de los peces la secreción exócrina del hígado, la bilis, se almacena en la vesícula biliar que se comunica con el intestino anterior a través del conducto biliar.

### **1.3.8. Regulación de las secreciones**

En teleósteos la secreción ácida puede ser una respuesta reflejada a la ingestión del alimento y parece evidente el efecto de la distensión estomacal mediada por la vagotomía. Los estudios sobre los péptidos activadores o inhibidores de las secreciones digestivas en los peces son contradictorios, sin embargo, parece generalizada la acción estimulante de una sustancia similar a la colecistoquinina (CCK) de vertebrados superiores. Se podría considerar que el modelo de regulación de las secreciones digestivas en peces representa un estadio primitivo del modelo existente en mamíferos que tiene una doble naturaleza hormonal y nerviosa. En contraste en peces existe relativa indiferenciación de la respuesta a distintas hormonas (Alárcon, 1997).

## **1.4. Enzimas digestivas en larvas de peces marinos**

Una de las razones por las cuales la supervivencia de las larvas de peces marinos en cultivo es muy baja, es debido al desconocimiento de su capacidad digestiva, ya que en muchos de los casos, no se toma en cuenta que las transformaciones morfológicas internas más importantes (como son la formación y acomodamiento progresivo de los principales órganos y el incremento en su funcionalidad), las cuales normalmente ocurren durante el primer mes de desarrollo (Alarcon, 1997 y Kurokawa *et al.*, 1998). La gran mayoría de los peces marinos al momento de la eclosión carecen de un estómago funcional y su tracto gastrointestinal se desarrolla progresivamente (Zambonino-Infante y Cahu, 2001).

Diversos autores han realizado estudios en varias especies de peces marinos demostrando que el estómago, el páncreas y el intestino no se encuentran completamente desarrollados y maduros al momento de la eclosión y que estos órganos presentan algunos cambios morfológicos y funcionales durante el desarrollo larval que difieren dependiendo de la edad y el estado nutricional. Así mismo, estos estudios han sentado las bases para describir y determinar la capacidad digestiva de las distintas especies (Douglas *et al.*, 1999; Zambonino-Infante y Cahu, 1994, 2001; Gisbert *et al.*, 2004, 2008; Murray *et al.*, 2004, 2006; Chen *et al.*, 2006; García-Gasca *et al.*, 2006; Álvarez-González *et al.*, 2006, 2008, 2010).

Las enzimas digestivas son secretadas en diversos órganos, incluyendo el estómago, el páncreas, la vesícula biliar y las paredes del intestino. Sin embargo,

se ha demostrado que un porcentaje bajo de las enzimas (1 %) pueden provenir de las presas vivas o de las bacterias que conforman la flora intestinal (Lauff y Hoffer, 1984; Kurokawa *et al.*, 1998).

El páncreas sintetiza y secreta en el lumen del intestino una cantidad de enzimas (proteasas, lipasas y carbohidrasas pancreáticas) en forma de precursores inactivos (zimógenos). Entre las proteasas más importantes se pueden mencionar a la tripsina, la quimiotripsina y la elastasa. Así mismo, entre las lipasas se destacan la lipasa neutra dependiente de sales biliares y las fosfolipasas. Por su parte entre las carbohidrasas más primordiales se encuentran las amilasas y las maltasas (Kolkovski y Sakakura. 2007).

El hígado es uno de los primeros órganos en desarrollarse y está involucrado en la absorción del saco vitelino. El páncreas y la vesícula biliar, están relacionados con la digestión de proteínas, lípidos y carbohidratos, se diferencian poco tiempo después, sin embargo, son completamente funcionales al momento de la primera alimentación exógena (Lauff y Hoffer, 1984; Kurokawa *et al.*, 1998). Cuando el estómago está completamente desarrollado y funcional, la digestión de proteínas de las larvas de peces inicia en un medio ácido (HCl) el cual activa a la enzima pepsina que es la enzima principal en el estómago. En contraste con aquellas larvas de peces marinos que no secretan ácido clorhídrico y por lo tanto ni pepsinógeno para digerir las proteínas, la digestión se realiza esencialmente con las enzimas pancreáticas e intestinales activas en un medio alcalino (Tanaka 1973; Tanaka *et al.*, 1976, Rønnestad, *et al.*, 2003).

Por otro lado, en el intestino la digestión se lleva a cabo a través de procesos tanto intracelulares como extracelulares (Smith, 1989). Las enzimas que participan en estos procesos pueden estar localizadas en el lumen intestinal, por ejemplo, enzimas secretadas por el páncreas como la tripsina y la quimotripsina, así mismo, las adheridas a la membrana del epitelio intestinal (borde en cepillo) como lo son la aminopeptidasa o la fosfatasa alcalina o en el interior de las células algunos tipos de catepsinas. Watanabe (1984), observó la absorción de proteínas (peroxidasa del rábano) por medio de pinocitosis y su posterior digestión intraenterocítica por medio de lisosomas, lo cual resultó que la digestión intracelular se realiza principalmente en la región posterior del intestino. Este mecanismo de digestión es más importante en larvas que en peces juveniles o adultos, y se cree que la digestión intracelular compensa la baja digestión extracelular exhibida durante la etapa larvaria (Watanabe, 1984; Cahu *et al.*, 1995).

Los lípidos son principalmente degradados por dos tipos de enzimas, la lipasa neutra no-específica que es activada por sales biliares y lipasa pancreática específica activada por co-lipasa y sales biliares (Izquierdo *et al.*, 2000). Los lípidos son emulsificados por las sales biliares para facilitar su digestión. Las enzimas actúan sobre sus respectivos sustratos lipídicos liberando ácidos grasos, los cuales son absorbidos por las células de la pared del intestino anterior (Smith, 1989). Así mismo, se ha encontrado actividad de amilasa y maltasa en la mayoría de las larvas estudiadas. Se considera que al iniciar la alimentación exógena las

larvas ya poseen enzimas digestivas, en términos de regionalización intestinal, las proteínas son digeridas y absorbidas en la parte posterior del intestino, mientras que la digestión de lípidos ocurre principalmente en la parte anterior del intestino (Govoni *et al.*, 1986).

### **1.5. Estudios sobre peces marinos en México**

En los últimos años en México se ha incrementado considerablemente el interés del cultivo de peces marinos de importancia comercial y con ello el estudio de su nutrición. Especies como totoaba (*Totoaba macdonaldi*), corvina blanca (*Atractoscion nobilis*), lenguado (*Paralichthys californicus*), jurel aleta amarilla (*Seriola dorsalis*), cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*), botete diana (*Sphoeroides annulatus*), pargo lunarejo (*Lutjanus guttatus*) están siendo estudiadas con diferentes grados de avances (Civera-Cerecedo *et al.*, 2002; Duncan *et al.*, 2003; Gisbert *et al.*, 2004; García-Ortega *et al.*, 2009; López *et al.*, 2009; Galaviz *et al.*, 2011). El grado de avance difiere entre especies, sin embargo, en la actualidad los cultivos comerciales de peces marinos en México se limitan principalmente a la engorda en jaulas de organismos capturados en medio natural debido a la incapacidad de lograr su cultivo larvario (García-Ortega, 2002; y Avilés-Quevedo, 2005). Los problemas en la larvicultura de peces marinos principalmente están relacionados con los aspectos de nutrición y alimentación.

Recientemente se han realizado estudios en México sobre desarrollo del sistema digestivo, actividad enzimática, requerimientos de proteínas, lípidos y carbohidratos, en especies como *A. nobilis* (Valverde, 2002; López *et al.*, 2006,

2009; Durazo *et al.*, 2010), *P. californicus* (Gisbert *et al.*, 2004; Álvarez-González *et al.*, 2006; Zacarias-Zoto *et al.*, 2006), *S. annulatus* (García-Ortega *et al.*, 2002; García-Gasca *et al.*, 2006; García-Ortega, 2009), *L. guttatus* (García-Ortega *et al.*, 2009; Abdo de la Parra *et al.*, 2010) y *P. maculatofasciatus* (Peña *et al.*, 2003; Álvarez-González *et al.*, 2008, y 2010). Se ha logrado un gran avance en estudios sobre fisiología digestiva en etapas larvarias y ampliado el conocimiento sobre los requerimientos nutricionales en etapas de engorda (juveniles y adultos). A pesar de ello, se han presentado diversas dificultades relacionadas con el desconocimiento exacto de las condiciones ambientales óptimas para el cultivo, falta de información acerca de los hábitos alimenticios y requerimientos nutricionales. Los cambios ontogenéticos y del crecimiento larval son información vital para poder llevar a cabo con éxito dicha actividad y mantener un estado nutricional óptimo hasta la etapa de juveniles y/o adultos. En México existen especies de peces marinos con oportunidad de ser explotadas para su cultivo comercial, entre ellos están *Totoaba macdonaldi*, *Atractoscion nobilis* y *Lutjanus guttatus*. Especies para las cuales es indispensable conocer el desarrollo del sistema digestivo y sus capacidades enzimáticas de nutrición, por lo que en este trabajo analizaremos la expresión y actividad de tripsina, quimiotripsina y pepsina durante el desarrollo del sistema digestivo en larvas y juveniles de totoaba, corvina blanca y pargo lunarejo, alimentadas con alimento vivo y durante el periodo de destete.

**1.5.1. Totoaba (*T. macdonaldi*)**

**Clasificación taxonómica**

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Clase: Actinopterygii

Orden: Perciformes.

Familia: Sciaenidae.

Género: *Totoaba*.

Especie: *macdonaldi*

La totoaba (Figura 2) se encontraba clasificada en el género *Cynoscion*, género en el que la totoaba era la especie que alcanzaba la mayor talla dentro de su familia (Sciaenidae) alcanzando tallas cercanas a los dos metros de longitud (Berdegué, 1955) y pesos superiores a los 135 kg (Cannon, 1966). Actualmente se encuentra clasificada como *Totoaba macdonaldi*, en un género y especie única para esta familia. *T. macdonaldi* es un pez endémico del Golfo de California (Cisneros-Mata *et al.*, 1997). A partir de 1975 ha sido incluida en la lista de especies en peligro de extinción (CITES, 2005). La pesquería de la totoaba se caracterizó por un acelerado crecimiento, siendo su industrialización uno de los episodios más interesantes en la historia de las pesquerías en nuestro país. A principios de 1900 se exportaba su vejiga gaseosa a oriente para ser utilizado como principal ingrediente en una sopa gourmet (Berdegué 1955). En 1942 la captura de esta especie alcanzó un máximo de 2,261 toneladas, posteriormente, sin importar el

incremento en el esfuerzo pesquero, la producción anual fluctuó hasta llegar a capturar sólo 58 toneladas en 1975 (Flanagan y Hendrickson, 1976).

Aunque se han postulado diversas causas probables que afectan a las poblaciones de este importante recurso, la información que existe sobre la totoaba sigue siendo muy limitada. Sin embargo, existen trabajos sobre su pesquería (Berdegué, 1955), ecología y biología (Flanagan y Hendrickson, 1976; Cisneros-Mata *et al.*, 1995). Asimismo, se han llevado a cabo estudios sobre su desarrollo embrionario (Morales-Ortiz, 1999), desarrollo larval (Sandoval-Garibaldi, 2001) y requerimientos nutricionales. En éstos se ha investigado el efecto de diferentes niveles de ácidos grasos, dietas isoprotéicas, niveles de alimentación, etc. (López *et al.*, 2006; Solórzano-Salazar, 2006 y Vizcaíno-Pérez, 2008). Sin embargo, se desconoce la capacidad digestiva de las larvas en cautiverio y actualmente no se cuenta con un protocolo de alimentación adecuado durante el desarrollo larval.

Actualmente la Unidad de Biotecnología en Piscicultura de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California, lleva a cabo programas de repoblamiento de juveniles obtenidos mediante el desove de reproductores mantenidos en cautiverio (True *et al.*, 1997, 2001) Sin embargo, la maduración y reproducción logradas han sido generalmente limitadas (calidad de huevo), lo que podría atribuirse al desconocimiento de sus requerimientos nutricionales (López *et al.*, 2006). A pesar de todos los esfuerzos realizados para repoblar el Golfo de California, aun existen una serie de limitantes para realizar el

cultivo a escala comercial, ya que hace falta información detallada sobre la nutrición y fisiología digestiva en larvas y juveniles de esta especie.



Figura 2. Reproductores de *T. macdonaldi* en las instalaciones de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura, Facultad de Ciencias Marinas (UABC), Ensenada B.C. (foto Richard Hermman).

### 1.5.2. Corvina blanca (*Atractoscion nobilis*)

#### POSICIÓN TAXONOMICA

Reyno: Animal

Phylum: Chordata

Clase: Actinopterygii

Orden: Perciformes

Familia: Sciaenidae (Corvinas)

Género: *Atroctoscion*

Especie: *nobilis*

Nombre común: Corvina blanca

La corvina blanca (*A. nobilis*) (Figura 3) es miembro de la familia Sciaenidae. Se trata de la familia que cuenta con ejemplares tamaño grande. En aguas de California E.U.A, se han llegado a encontrar organismos de hasta de 1.5 metros y con un peso de 41 kg (Thomas 1968). Sin embargo, la mayoría de los organismos son más pequeños (71.1 cm y 3.2 kg), y rara vez se encuentran organismos que pesan más de 27.21 kg (Thomas 1968). Al igual que otras corvinas, el macho de corvina blanca emite un característico “ronquido” por vibraciones de la vejiga de aire.

*A. nobilis* es un pez pelágico que presenta una amplia distribución en el área noreste del Océano Pacífico, se encuentra desde Juneau en Alaska hasta Bahía Magdalena en Baja California Sur, México. Es una especie altamente apreciada en la pesca comercial y deportiva en las aguas del Sur de California y Baja California (Vojkovich y Reed, 1983). En su hábitat natural la corvina blanca es de naturaleza carnívora, se alimenta de anchoveta, arenque, sardina, calamar y cangrejos pelágicos.

En E.U.A. se considera que la especie esta sobreexplotada e históricamente las capturas comerciales y recreativas en E.U.A. y México han

sufrido amplias fluctuaciones (CalCOFI, 2006), durante el periodo de 1963 a 1967 la pesca deportiva de corvina blanca disminuyó de una captura de 19,000 organismos hasta sólo 2,000 ejemplares. Sin embargo, información indica que desde 1997 la captura se ha incrementado en un 78 a 80% para el año 2008 (CalCOFI, 2002). En México no existen datos que indiquen sobreexplotación de la corvina blanca, sin embargo en el 2010 únicamente se registró un total de capturas de 8,132 kg en total en todo el territorio nacional (AEP, 2010).

Por su parte del gobierno de E.U.A. ha tomado acciones en cuanto a la legislación sobre el número y la talla de captura permitida, así como el establecimiento de un período de veda (Dotson y Charter, 2003). En 1983 se creó un programa de crianza y mejoramiento de recursos del océano (Ocean Resources Enhancement Hatchery Program), del cual la corvina blanca ha sido una de las principales especies para investigación (CalCOFI, 2002).

Desde 1986 el Instituto Hubbs-Sea World Research (IH-SWR) en California, comenzó a liberar en las costas de California juveniles de corvina blanca cultivados en las aguas costeras del sur de California. En la actualidad, el IH-SWR posee un programa piloto para determinar la factibilidad de cultivarla hasta la talla comercial con el fin de disminuir la presión pesquera sobre esta especie.

Para que una especie pueda ser considerada para cultivo debe presentar un alto valor en el mercado, debe ser tolerante al manejo y a los cambios ambientales, ser capaz de reproducirse en cautiverio para la producción de huevos, larvas y juveniles así como, presentar crecimiento rápido a altas

densidades con buenas tasas de conversión alimenticia, características que cumple *A. nobilis*. Actualmente se cultiva a baja escala en jaulas, tanques y canales (California Department of Fish and Game, 2002), su alimentación se basa en dietas comerciales para peces que no han sido elaboradas con base en los requerimientos nutricionales de la especie.

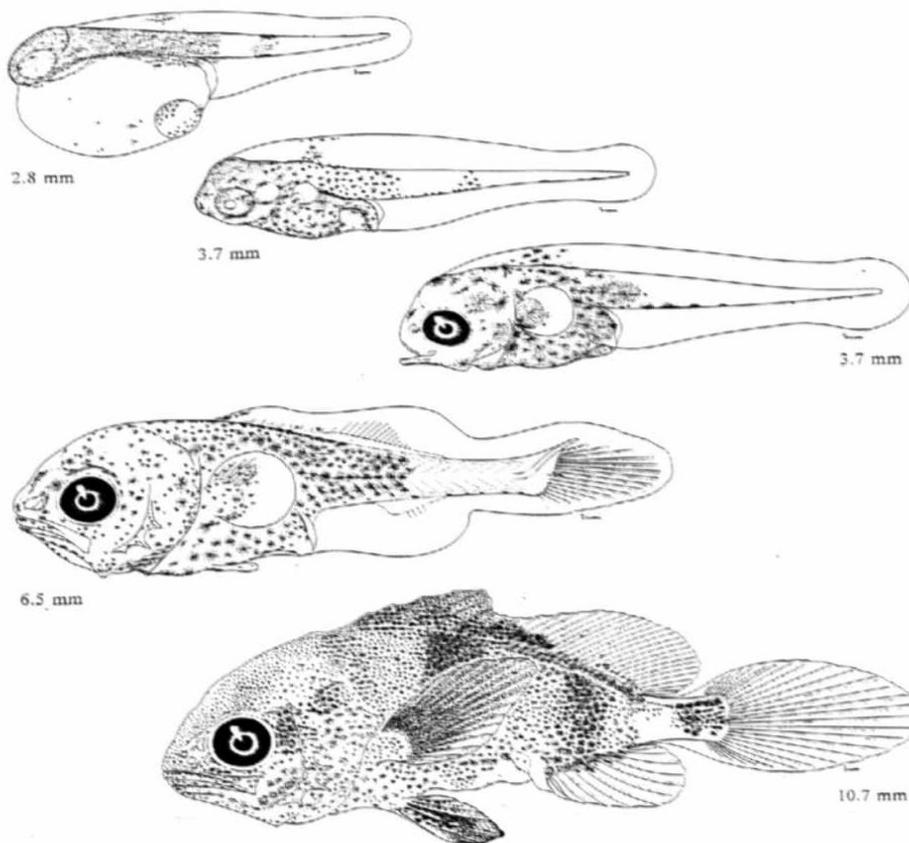


Figura 3. Desarrollo larvario de corvina blanca. Larva con saco vitelino, 2.8 mm, 3.7mm; larva en estadio de preflexión, 3.7 mm; larva en estadio de flexión 6.5 mm; larva (Figura tomada de Moser, 1983).

El número de estudios sobre aspectos larvales de la especie *A. nobilis* son reducidos entre ellos se encuentran los trabajos sobre: morfología externa de

huevos, larvas y juveniles (Mosert *et al.*, 1983), la ecología alimenticia de las larvas (Dutton, 1992), experiencia de las larvas en el éxito de captura de presas y el efecto de la densidad de siembra y concentración del alimento en su crecimiento y supervivencia.

Gauger *et al.* (2007) correlacionan la calidad de huevos y larvas de corvina blanca (*A. nobilis*) con las distintas condiciones de cultivo. Los autores proponen definir los factores que tienen efecto directo sobre la condición nutricional de huevos y larvas donde incluyen una proporción de sexos, fotoperíodo y temperatura; ya que han observado desoves de mala calidad, con subsiguiente muerte de las larvas durante la primera alimentación exógena.

Jirsa *et al.* (2007) estudiaron el efecto del color del tanque, intensidad de luz sobre el crecimiento, sobrevivencia y tolerancia al estrés en larvas de corvina blanca, los autores encontraron que la sobrevivencia no es afectada por ninguno de los factores antes mencionados, sin embargo, mencionan que la intensidad de luz si puede tener efectos sobre el crecimiento y tolerancia al estrés.

Sin embargo existe muy poca información sobre estudios sobre fisiología digestiva en larvas de esta especie. Uno de los estudios con respecto al desarrollo de la fisiología digestiva con larvas de *A. nobilis* fue realizado por Valverde (2002) quien determinó la capacidad digestiva de las larvas de corvina blanca y evaluó si la digestibilidad de fuentes proteicas específicas cambia durante la ontogenia encontrando actividad alcalina proteolítica tipo tripsina, leucina-aminopeptidasa y quimotripsina antes de la primera alimentación. Por tanto, sugiere que la alta

actividad específica inicial está programada genéticamente y no está únicamente determinada por la ingesta de alimento vivo. Sin embargo, también sugirió que es probable que las características físico-químicas del agua también modulen en cierta medida los niveles de actividad de las enzimas digestivas. Además en este trabajo realizaron el estudio del desarrollo del sistema digestivo encontrado que las glándulas gástricas aparecen el dpe 16.

En relación a estudios con juveniles de corvina blanca, Kent *et al.* (2001) analizaron el efecto de niveles de carbohidratos-lípidos sobre crecimiento y sobrevivencia de juveniles de *A. nobilis*, reportando un máximo crecimiento (de 2.05 a 42.24 g) durante 55 días, con una dieta formulada con 55.1% de proteína cruda y 14.2% de lípidos totales. Por su parte, López *et al.* (2006, 2009) analizaron el efecto del nivel de lípidos sobre el crecimiento, composición corporal y perfil de ácidos grasos en postlarvas de corvina blanca y encontrando la máxima ganancia en peso (de 0.65 a 22.2 g) durante 50 días con una dieta formulada que contenía 61.5% de proteína cruda, 15.5% de lípidos totales y 26.35 g/mJ de DP/DE.

López *et al.* (2009), realizaron un estudio donde el objetivo principal fue determinar el nivel óptimo de lípidos en la dieta para juveniles de corvina blanca (*A. nobilis*). Dietas experimentales isonitrogenadas fueron formuladas con aumento en los niveles de lípidos (2.6, 7.4, 11.6, 15.3 y 19.4%) utilizando aceite de lacha como la fuente de lípidos que peso final del cuerpo entero, el índice de conversión, y la eficiencia de retención de nitrógeno fueron significativamente

mayores para las dietas de 15,3 y 19,4 % de lípidos en comparación con el resto de los tratamientos. Así mismo, encontraron que el contenido de lípidos de cuerpo entero, músculo y el hígado aumentó con el aumento de los niveles de lípidos en la dieta.

Durazo *et al.* (2010) realizaron un estudio para estimar los efectos de las dietas isonitrogenadas que contenían harina de pescado tratada con formaldehído y diferentes niveles de proteína digestible (541, 491, 372, 347 and 247 g kg<sup>-1</sup>) en el crecimiento y la composición del tejido en juveniles de corvina blanca y encontraron que el coeficiente de digestibilidad aparente de proteína en la dieta no se vio afectada significativamente por la inclusión de harina de pescado tratada en las dietas. Así mismo, encontraron que el requerimiento estimado de proteína usando un análisis de regresión lineal (Broken line analysis) indican que el peso máximo ganado puede darse utilizando una dieta que contenga 503 ± 23 g kg<sup>-1</sup> de proteína digerible.

### **1.5.3. Pargo lunarejo (*L. guttatus*)**

#### **Clasificación taxonómica**

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Clase: Actinopterygii

Orden: Perciformes

Familia: Lutjanidae

Género: *Lutjanus*

Especie: *guttatus*

Nombre común: Pargo lunarejo

El pargo lunarejo (*L. guttatus*) (Figura 4) de la familia Lutjanidae, es una especie de pez marino que vive en arrecifes costeros, hasta 30 m de profundidad, es una especie que se puede encontrar solitaria o en grupos y forma grandes cardúmenes (Figura 4). Esta especie se distribuye desde el Golfo de California, México hasta Perú (Allen y Robertson, 1994). Llega a medir hasta 97 cm de longitud total con peso aproximado de 5.5.kg. Se alimenta principalmente de invertebrados y peces. Es una especie considerada con potencial de cultivo ya que alcanza precios de 60-70 pesos kg de producto fresco entero en los mercados locales, nacionales e internacionales. Su potencial de cultivo también radica en su demanda comercial, su capacidad de adaptación y el control de su reproducción en cautiverio (Ibarra-Castro y Duncan, 2007). Además, se cuenta con la información biológica y los protocolos para producir juveniles en laboratorio (García-Ortega *et al.*, 2005; Boza-Abarca *et al.*, 2008)

Actualmente es objeto de estudios a nivel piloto en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD Unidad-Mazatlán). Los resultados que se han obtenido son optimistas ya que la producción de larvas se ha logrado de manera sostenida, lo que indica la posibilidad de lograr producción a nivel comercial (Duncan *et al.*, 2003). Sin embargo, el cultivo larvario presenta retos en lo que se refiere a la fisiología digestiva.



Figura 4. .Juveniles de *L. guttatus* cultivados en instalaciones del CIAD Unidad-Mazatlán (foto A. García-Ortega).

Debido a que se carece de información relacionada con el desarrollo del sistema digestivo, actividad y expresión de enzimas digestivas como tripsina, quimotripsina y pepsina en larvas y juveniles de totoaba, pargo y corvina blanca, es de suma importancia el llevar a cabo estudios donde podamos obtener datos que nos permitan desarrollar protocolos de alimentación y dietas específicas para cada una de las especies en estudio. Por todo lo anterior se considera necesario el generar conocimiento que permita evaluar el estado nutricional de larvas y

juveniles de corvina blanca (*A. nobilis*), totoaba (*T. macdonaldi*) y pargo (*L. guttatus*) con la intención de mejorar el crecimiento, sobrevivencia y condiciones de cultivo

## **2. Antecedentes generales**

### **2.1. Desarrollo del sistema digestivo**

En las larvas de peces marinos recién eclosionadas, el tracto digestivo es un tubo recto y sin diferencias histológicas que descansa dorsalmente sobre la vesícula vitelina y está cerrado por ambos extremos (boca y ano). Después de la absorción de las reservas vitelinas se pueden observar varias regiones con diferencias histológicas y funcionales (Govoni, 1980).

Varios estudios han descrito el desarrollo de los órganos del tracto digestivo en diversas especies de peces marinos como el *Dicentrarchus labrax* (Cahu y Zambonino-Infante, 1995), el *Solea senegalensis* (Ribeiro *et al.*, 1999), el *Gadus morhua* (Hamlin *et al.*, 2000) y el *P. californicus* (Gisbert *et al.*, 2004). Sin embargo, hay poca información disponible acerca del desarrollo del tracto digestivo y de la capacidad enzimática en larvas de peces tropicales. Estos datos podrían ser utilizados para evaluar la capacidad digestiva con dietas formuladas.

Durante la fase larvaria el canal alimentario es estructural y funcionalmente menos complejo que el de los adultos, y afecta la capacidad digestiva del organismo (Baglolle *et al.*, 1998; Zacarías *et al.*, 2006). Debido a la falta de funcionalidad del estómago, la mayoría de las larvas de peces dependen de las enzimas digestivas del páncreas, el cual es completamente funcional al finalizar el

consumo del saco vitelino (Darias *et al.*, 2005). Posteriormente, con la contribución de la pepsina y las microvellosidades de las membranas en el intestino, el proceso de digestión de los juveniles llega a ser similar al de los adultos (Darias *et al.*, 2005). La apropiada digestión y asimilación de las presas ingeridas garantizan el crecimiento y supervivencia durante las primeras semanas de alimentación exógena (Gisbert *et al.*, 2004; Álvarez-González *et al.*, 2006). Una de las fases críticas durante el desarrollo larvario de peces marinos es el comienzo de la alimentación exógena. Cuando la mayoría de las larvas de peces inician la ingestión, el tracto digestivo es ya funcional (Segner *et al.*, 1994) aunque menos desarrollado que el de los juveniles y adultos, tanto desde el punto de vista morfológico como fisiológico (Kjorsvik *et al.*, 1991; Sarasquete *et al.*, 1993; 1995).

Por ejemplo en las larvas del bagre africano (*Clarias gariepinus*) el sistema digestivo se vuelve completamente funcional en el día 5 después del inicio de la alimentación exógena, sin embargo, las larvas tienen la capacidad de digerir y asimilar los nutrientes del alimento vivo a partir del día 1 (Verreth *et al.*, 1992). De manera similar, las larvas del pez blanco (*Coregonus lavaretus*) tienen la capacidad para una digestión óptima del alimento vivo al inicio de su alimentación exógena (Segner *et al.*, 1989).

Hamlin *et al.* (2000) realizaron un trabajo donde estudiaron el desarrollo del tracto digestivo y órganos asociados en larvas del Abadejo (*Melanogrammus aeglefinus*), con el propósito de describir el desarrollo del canal alimenticio, hígado, páncreas, vesícula y vejiga natatoria, para proveer las bases para estudios

futuros en requerimientos nutricionales para esta especie. Los autores encontraron que al momento de la eclosión esta especie presenta características similares a la de otras especies de peces marinos, con un esófago desprovisto de células caliciformes, el intestino como un simple tubo indiferenciado que se encuentra dorsalmente sobre el saco vitelino, así como numerosos gránulos de zimógenos están presentes en el páncreas.

La formación del páncreas difuso y la síntesis de enzimas digestivas en el lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*) fue estudiado por Kurokawa y Suzuki (1996), quienes observaron que en el dpe 3 el páncreas aparece como un órgano compacto localizado alrededor de la vesícula biliar y cerca del hígado, además de que la síntesis de tripsinógeno comenzó en las células de acinar en el lumen del intestino.

En la mayoría de los estudios realizados con larvas de peces se observa un incremento progresivo en la actividad de las enzimas digestivas con respecto a la edad, aunque en muchos casos puede verse interrumpido temporalmente por descensos bruscos, posiblemente debidos a cambios morfológicos y/o nutricionales que tienen lugar durante los distintos estadios del desarrollo larvario (Holt, 1993; Ueberschar, 1993). En la mayoría de los peces la actividad digestiva más estudiada corresponde a las proteasas digestivas, quizá debido a que la proteína es el nutriente que se encuentra en mayor proporción en las dietas (en ocasiones más del 50%), sin embargo, otras enzimas importantes en la digestión son las amilasas y las lipasas.

En larvas del lenguado de California se observó que al momento de la eclosión, su sistema digestivo estaba indiferenciado y tanto la boca como el ano se encontraban cerrados (Zacarías-Soto *et al.*, 2006). La diferenciación del canal alimenticio (esófago, intestino pre- y post-valvular) fue evidente en el dpe 3 (momento de la primera alimentación). Los gránulos zimógenos (precursores de las enzimas pancreáticas) son detectados en el páncreas un día antes de iniciar la alimentación exógena y su número aumenta en la primera alimentación. El estómago se diferencia morfológicamente entre los dpe 27 y 30, en sincronía con el inicio de la migración del ojo (metamorfosis) (Gisbert *et al.*, 2004; Zacarías-Soto *et al.*, 2006).

Kolkovski (2001) en su estudio sobre enzimas digestivas en larvas y juveniles de peces - implicaciones y aplicaciones para formular dietas menciona que al principio de la alimentación, el tracto digestivo de las especies de peces contienen enzimas relacionadas con la digestión, metabolismo, absorción y asimilación de moléculas tales como proteínas, lípidos y glicógeno, y que la actividad de enzimas digestivas es relativamente baja comparada con los niveles de peces adultos. Kolkovski y Dabrowski (1999), demostraron que hasta hoy en día el uso de alimento vivo es esencial al principio de las fases larvarias de peces y que las necesidades dietéticas para el crecimiento de las larvas son diferentes a las de los peces en su fase adulta.

Zambonino-Infante *et al.*, 1996; Cahu *et al.*, 2004; Alvarez-Gonzalez *et al.*, 2006, 2008, 2010) consideran que la inhabilidad de las larvas de peces para usar

las microdietas formuladas se debe a la insuficiente actividad de las enzimas digestivas, y que tal deficiencia, en el caso de las larvas silvestres, se ve compensada por las enzimas digestivas de las presas vivas. Sin embargo, Zambonino-Infante y Cahu (1994) encontraron que las larvas de la lobina Europea (*D. labrax*) presentan una alta actividad de las enzimas pancreáticas aún cuando no se les alimenta con presas vivas.

Otros estudios han medido la expresión génica de las enzimas digestivas como indicador del desarrollo fisiológico de las larvas de peces marinos, en relación a cambios ambientales y nutricionales. En este contexto Kurokawa *et al.*, (2002), analizaron el nivel de expresión de genes de tripsina, lipasa y amilasa provenientes del páncreas en larvas de *Anguilla japonica.*, encontraron que en el dpe 6 se detectó la expresión de mRNA de amilasa y tripsinógeno y que en el dpe 8 se detectó lipasa. Por último reportaron que en el dpe 8 las larvas comienzan alimentarse activamente coincidiendo con el desarrollo del páncreas. Murray *et al.*, (2006) realizaron un estudio sobre expresión de tres enzimas digestivas durante el desarrollo larval en *H. hippoglossus* con el objetivo de predecir la funcionalidad del sistema gastrointestinal. Encontraron que al momento de la primera alimentación el tracto digestivo estaba dividido en tres regiones; anterior, medio y posterior, así mismo, el hígado y páncreas estaban presentes. Las glándulas gástricas funcionales fueron observadas hasta el dpe 66. Además, utilizando cebadores de secuencias de genes de enzimas digestivas de *P. americanus* fue posible amplificar secuencias parciales para lipasa dependiente de sales biliares,

tripsinógeno y pepsinógeno, encontrando que la expresión de lipasa y tripsinógeno fue evidente al momento de la primera alimentación, pero la expresión del gen de pepsinógeno fue observado hasta el dpe 80.

Péres y colaboradores (1998) analizaron los niveles de actividad y expresión del mRNA de tripsina y amilasa desde el dpe 20 hasta el dpe 40 en larvas de *D. labrax*. En este estudio las larvas fueron alimentadas con dos tipos de alimento que consistió en dos raciones de nauplios de *Artemia* (saciedad y una octava parte de la ración de saciedad) y dos dietas isoenergéticas con diferente nivel de proteína (30 y 60 %) y carbohidratos (37 y 7 %) respectivamente. Los autores encontraron que los niveles de actividad y expresión del mRNA de tripsina fueron influenciados por la naturaleza de la proteína contenida en la dieta y por la ración de nauplios de *Artemia*. Pero utilizando harina de pescado como fuente de proteína, la concentración de proteína en la dieta no afecta el nivel de actividad y expresión del mRNA de tripsina. Estos resultados sugieren que la síntesis de tripsina no se ve afectada a nivel transcripcional por la ración de proteínas, en este caso por ejemplo con la ración de nauplios de *Artemia*. Mientras que la actividad y expresión del nivel del mRNA de amilasa fue influenciada tanto por el origen como por la proporción de carbohidratos en el alimento, así como por la edad de los organismos (dpe 20 y 40).

La expresión génica de las enzimas tripsina, quimotripsina, elastasa, carboxilpepsidasa (A y B) y lipasa se ha detectado en el páncreas de las larvas de muchos peces marinos. En el caso del lenguado japonés (*P. olivaceus*) se detectó

la expresión del tripsinógeno desde la primera alimentación a los 3 días post-fertilización (Srivastava *et al.*, 2002). En un estudio similar la expresión del gen de tripsinógeno fue detectado en etapas tempranas del desarrollo del botete diana (*S. annulatus*), inició en huevos fertilizados, mostrando un incremento importante 75 horas después de la fertilización y posteriormente incrementó gradualmente durante todo el desarrollo larval hasta el destete, momento en que se apreció un decremento significativo (García-Gasca *et al.*, 2006).

En el lenguado de invierno, se detectaron dos formas posibles del pepsinógeno A que difirieron en su punto isoeléctrico. Estas dos formas se aislaron a partir del estómago de larvas al dpe 13 (Douglas *et al.*, 1999), el análisis por RT-PCR indicó que estos pepsinógenos se expresan secuencialmente. La expresión del pepsinógeno A Ila se detectó en larvas de 13 dpe e incrementó conforme inició la metamorfosis. El pepsinógeno A IIb se expresó junto con el promotor  $\alpha$  responsable de la secreción de ácido clorhídrico a los 20 dpe, tiempo en el cual aparecieron las glándulas gástricas y el incremento de la actividad de las pepsinas, a partir de estos resultados los autores consideran pertinente alimentar las larvas del lenguado de invierno de 20 dpe con una dieta formulada. Posteriormente, se determinó por análisis de hibridación *in situ* que la expresión de los pepsinógenos Ila, IIb y el promotor  $\alpha$  ocurre en algunas células de las glándulas gástricas, lo que demostró que éstas células son capaces de sintetizar pepsinógenos y secretar ácido clorhídrico simultáneamente (Gawlicka *et al.*, 2001).

En un estudio sobre la ontogenia del estómago funcional durante el desarrollo larval de la dorada común (*Pagrus pagrus*) se localizó por hibridación in situ el mRNA de un pepsinógeno. Los primeros signos de la presencia de glándulas gástricas se detectaron a los 19 dpe, completando su desarrollo a los 26 dpe. La expresión del pepsinógeno fue evidente en las glándulas gástricas a partir de los 30 dpe. Las condiciones ácidas y por ende el jugo gástrico se detectaron en larvas alimentadas con nauplios de Artemia y Artemia adulta alrededor de los 35 dpe (Darias *et al.*, 2005).

Los estudios de expresión y actividad de enzimas digestivas en larvas de peces marinos representan una fuente de información importante sobre el funcionamiento de la fisiología digestiva de las larvas de peces marinos, con el propósito de formular microdietas adecuadas durante el desarrollo larvario, ya que actualmente se busca optimizar el protocolo de cultivo a gran escala de totoaba (*T. macdonaldi*), corvina blanca (*A. nobilis*) y pargo lunarejo (*L. guttatus*) y resulta fundamental ampliar el conocimiento de la capacidad digestiva de las larvas de estas tres especies de peces marinos mediante el análisis de la expresión y la actividad de tres de las enzimas clave (tripsina, quimiotripsina y pepsina) en la digestión de nutrientes.

### **3. Justificación**

En los últimos años en México se ha incrementado considerablemente el interés del cultivo de peces marinos de importancia comercial y con ello el estudio de su nutrición. Sin embargo el desarrollo de una tecnología adecuada para el

cultivo de peces marinos se ha visto truncado debido a las altas tasas de mortalidad que ocurren durante el periodo larvario. El inicio de la alimentación exógena es el período más crítico en larvicultura de peces. La principal problemática asociada a este período larvario es en buena medida a la deficiente nutrición de las larvas, ya que si no se tienen conocimientos relacionado a sus capacidades digestivas y la maduración de sus órganos es incierto el poder ofrecer una dieta adecuada para cada etapa de desarrollo. Se ha observado que las altas mortalidades asociadas en los estadios larvales tempranos en peces marinos en general se deben en buena medida a la incapacidad del sistema digestivo para asimilar los nutrientes de manera eficiente. Por lo tanto, es fundamental realizar estudios destinados a evaluar la actividad de las principales enzimas digestivas durante el desarrollo larvario y juvenil, con el fin de obtener información que facilite la fabricación de alimentos adecuados para cada etapa de desarrollo. En este contexto, la presente investigación se realizó bajo la necesidad de estudiar la expresión y actividad de las principales enzimas digestivas durante una etapa que se considera el cuello de botella en la piscicultura marina. El presente trabajo de investigación favorecerá los estudios tendientes a mejorar el crecimiento y sobrevivencia en larvas y juveniles de totoaba (*T. macdonaldi*), corvina blanca (*A. nobilis*) pargo lunarejo (*L. guttatus*) ya que son especies con alto potencial de cultivo en las costas de Baja California y del Pacífico mexicano.

#### **4. Hipótesis**

En larvas de peces marinos como totoaba, corvina blanca y pargo lunarejo los niveles de expresión y actividad de enzimas digestivas presentarán fluctuaciones significativas en las etapas críticas del desarrollo y durante los cambios de alimentación.

#### **5. Objetivo general**

Estudiar el desarrollo del sistema digestivo, así como la expresión y actividad de enzimas digestivas (tripsina, quimotripsina y pepsina) durante el desarrollo larvario y juveniles de totoaba (*T. macdonaldi*), corvina blanca (*A. nobilis*) y pargo lunarejo (*L. guttatus*), bajo condiciones de cultivo.

##### **5.1 Objetivos específicos**

1. Describir el desarrollo del sistema digestivo en larvas y juveniles de totoaba (*T. macdonaldi*), corvina blanca (*A. nobilis*) y pargo lunarejo (*L. guttatus*).
2. Evaluar de manera cuantitativa la transcripción de las enzimas digestivas (tripsina, quimotripsina y pepsina) en larvas y juveniles de totoaba (*T. macdonaldi*), corvina blanca (*A. nobilis*) y pargo lunarejo (*L. guttatus*) bajo condiciones de cultivo.

3. Determinar los niveles de actividad de enzimas digestivas (tripsina, quimotripsina y pepsina) en larvas y juveniles de totoaba (*T. macdonaldi*), corvina blanca (*A. nobilis*) y pargo lunarejo (*L. guttatus*) bajo condiciones de cultivo.
4. Integrar la información generada y relacionarla a los esquemas de alimentación y nutrición practicados en cultivo para cada una de las especies estudiadas.

# **CAPITULO 2**

## **Totoaba**

## **2.0. Totoaba (*T. macdonaldi*)**

*T. macdonaldi* es un pez endémico del Golfo de California y es la especie de mayor talla entre los miembros de la familia Scianidae (Cisneros-Mata *et al.*, 1997). A partir de 1975 fue incluida en la lista de especies en peligro de extinción (CITES, 2005). La pesquería de la totoaba se caracterizó por un acelerado crecimiento, debido al consumo de su vejiga gaseosa (buche). Actualmente existe un programa de repoblamiento de esta especie en el Golfo de California por medio de la Facultad de Ciencias Marinas (UABC), sin embargo, el repoblamiento se ha visto afectado debido a la producción de larvas y juveniles en cantidades suficientes bajo condiciones de laboratorio. Posiblemente la escasa producción de larvas y juveniles se ha debido a que aún se desconoce la fisiología digestiva en larvas de esta especie y requerimientos nutricionales, por este motivo el propósito del presente estudio fue contribuir al entendimiento de fisiología digestiva de larvas de totoaba (*T. macdonaldi*), a través de la descripción del desarrollo del sistema digestivo, actividad y expresión de tripsina, quimiotripsina y pepsina. La información obtenida servirá como base para futuros estudios nutricionales, así mismo, para refinar el protocolo actual de cultivo y para desarrollar dietas formuladas adecuadas para las larvas de esta especie.

### **2.1. Protocolo de cultivo larvario de totoaba (*T. macdonaldi*)**

#### **2.1.1. Obtención de huevos y cultivo larvario**

Huevos y larvas de totoaba fueron obtenidos de reproductores mantenidos en cautiverio en la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) de la Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California campus Ensenada. Debido a que el desove no ocurre de forma espontánea en los tanques de reproducción de la UABC, se optó por utilizar la inducción hormonal a base de hormonas liberadoras de gonadotropinas (LHRHa) también llamada hormona liberadora de hormona luteinizante. Este método ha sido útil en muchos otros reproductores de peces. Su administración se realizó por medio de implantes a una dosis de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corporal. El implante se aplicó en el seno dorsal justo debajo de la aleta. Esta hormona tiene efecto tanto en hembras como en machos ya que estimula a la producción normal de las gonadotropinas, que son las hormonas naturales con controlan el proceso de la reproducción. En el caso de los machos induce a una mayor producción de semen e hidratación del mismo (semen más fluido), mientras que a las hembras las estimula a entrar en la fase final de maduración en la cual el ovocito sale de su arresto y procede a hidratarse y a la ovulación final.

Se seleccionaron dos machos y cuatro hembras y se les implantó LHRHa, posteriormente se pasaron a un tanque con control de temperatura y fotoperiodo controlados (25 °C y 14:10 h luz: oscuridad).

### **2.1.2. Recolecta de huevos de totoaba**

La colecta de huevos se realizó mediante drenado del tanque para lo cual se conectó el drenaje a un depósito de compensación donde se instaló un colector para huevos con una malla de 300  $\mu\text{m}$ . El cortejo de los peces machos y hembras inició 10 -12 horas después del implante de la hormona y la reproducción se dio 24 - 36 horas. Los huevos con flotación neutra se colectaron en el depósito de compensación entre 5 y 6 horas después del desove. Los huevos fueron colectados con una malla de 500  $\mu\text{m}$  y puestos en un contenedor con agua marina previamente filtrada. Posteriormente recibieron un baño con formol al 0.026% durante 20 minutos para eliminar las bacterias y protozoarios que pueden traer adheridos al corion. Este procedimiento se realizó en cubetas con aireación suficiente para que los huevos permanecieran en suspensión. Después de recibir el tratamiento, los huevos fueron lavados con agua de mar previamente filtrada y pasada por rayos ultravioleta con el fin de evitar presencia de agentes patógenos antes de la siembra. Los huevos se colocaron en probetas para separar los viables (con flotabilidad neutra) de no viables (se precipitan al fondo). Para facilitar la separación se incrementó la densidad del agua de mar. Para estimar la cantidad de huevos viables se tomaron varias muestras de un mililitro y se cuantificaron bajo un microscopio estereoscopio, de la misma manera se evaluaron los huevos no viables.

### **2.1.3. Tanques de cultivo larvario**

Huevos de totoaba fueron colocados a razón de 100 huevos L<sup>-1</sup> en incubadoras con capacidad de 2200 L con ambiente controlado (24 °C, 34 ups, 6 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>). La eclosión de los huevos se dio a las 20 horas después de haber sembrado las incubadoras, posteriormente a la eclosión se procedió a sifonear por primera vez el fondo para extraer los huevos que no eclosionaron y evitar una contaminación por materia orgánica descompuesta dentro del sistema. Antes de la primera alimentación exógena (dpe 3), las larvas de totoaba fueron transferidas a tanques cónicos con capacidad de 100 L, donde se llevó a cabo el cultivo experimental de donde se obtuvieron las muestras para análisis de histología, bioquímica y molecular. Las variables del agua de cultivo de los tanques experimentales se mantuvieron (24 °C, 34 ups, 6 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>) iguales a las incubadoras donde eclosionaron los huevos (Figura 5).

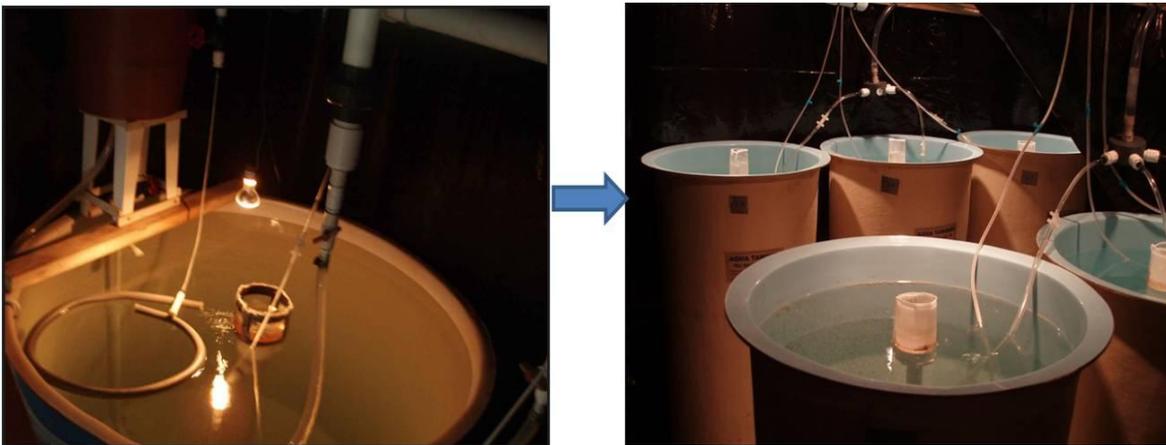


Figura 5. Tanques de cultivo larvario utilizados durante el desarrollo experimental de totoaba. Al lado izquierdo se muestra la incubadora de 2,200 L previamente sembrada con huevos de totoaba, mientras que al lado derecho se muestran los tanques de cultivo larvario de 100 L con larvas de totoaba transferidos desde la incubadora.

#### **2.1.4. Alimentación**

La alimentación de las larvas se proporciono de acuerdo al protocolo de UBP, el cual inició a partir del dpe 4 una vez que el saco vitelino y la gota de aceite fueron consumidos por completo. El primer alimento vivo que se le proporcionó a las larvas fueron rotíferos enriquecidos con ácidos grasos a razón de 5 rotíferos mL<sup>-1</sup> durante los primeros tres días después de haber iniciado la primera alimentación exógena. A partir del dpe 8 las larvas se alimentaron tres veces al día con 10 rotíferos por mL<sup>-1</sup> hasta el dpe 16, a partir de este día se empezaron a introducir nauplios de *Artemia* a razón de 0.5 mL<sup>-1</sup> enriquecidos con ácidos grasos y la densidad de rotíferos empezó a disminuir hasta que el dpe 20 fueron eliminados completamente del tanque de cultivo. Los nauplios de *Artemia* fueron en aumento de acuerdo a la edad de la larva llegando a proporcionar cinco nauplios mL<sup>-1</sup> para el dpe 24 y mantenerse hasta el inicio del cambio de alimento vivo a alimento inerte (destete) (Otohime Japanese Marine Weaning, Red Mariculture; proteína 52.11%, lípidos 16.3% y cenizas 11.2%, tamaño de partículas desde 200 hasta 1410 µm) que se realizó el dpe 28 en adelante. La cantidad de nauplios de *Artemia* disminuyeron conforme aumentaba el cambio de alimento y fueron eliminados del tanque de cultivo el dpe 34, mientras que la cantidad (g) de microdieta fue en aumento para completar el destete el dpe 34 (Figura 6). Al inicio de la alimentación exógena el flujo de agua incrementó a 4 L min<sup>-1</sup> y al iniciar la alimentación con nauplios de *Artemia*, el flujo de agua incrementó a 6 L min<sup>-1</sup>. Las incubadoras se sifonearon una vez durante el día al iniciar la primera alimentación

con rotíferos enriquecidos y dos veces hasta iniciar con la alimentación con nauplios de *Artemia* sp.

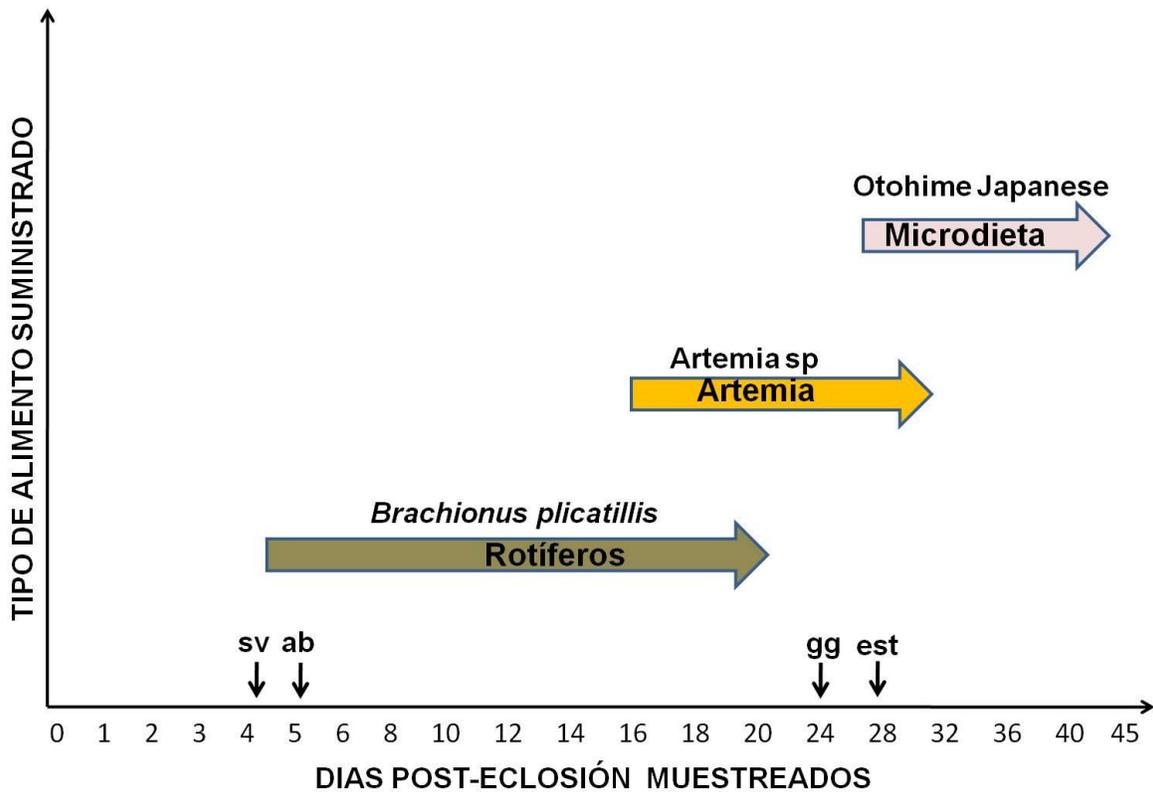


Figura 6. Protocolo de alimentación y toma de muestras durante el larvicultivo de totoaba (*T. macdonaldi*). (ab), apertura de la boca, (est), estómago, (gg), glándulas gástricas, (sv), absorción del saco vitelino.

## 2.2. Colecta de muestras para análisis histológico, bioquímico y molecular

Dependiendo de su talla, larvas de totoaba (n=30-100) fueron muestreadas aleatoriamente directamente de los tanques de cultivo experimental, usando una malla de 300µm. Las muestras fueron colectadas una hora después de la primera alimentación (8.00 a.m.) esto con el fin de descartar posibles efectos de enzimas provenientes de la dieta. Las muestras de larvas fueron colectadas diariamente

desde el dpe 0 hasta el dpe 6, luego las muestras fueron colectadas cada dos días hasta el dpe 20 y cada cuatro días hasta el final del estudio (dpe 40). Después de haber muestreado las larvas, éstas fueron anestesiadas con tricaina metansulfonato (MS 222), lavadas con agua destilada para remover el exceso de sales y congeladas a -70 °C hasta análisis.

Muestras adicionales (n=10-30) fueron tomadas diariamente para registrar datos de talla en longitud total y peso húmedo desde el dpe 0 hasta el dpe 4 y 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24, 28, 32, 36 y 40 dpe. La longitud total promedio (mm) fue obtenida mediante la medición de una muestra de larvas (10 larvas) bajo un microscopio usando una cámara digital y el software PAXcam2 (Pax-it version 6, Mis Inc., USA). El peso húmedo individual de las larvas (mg) fue calculado pesando tres submuestras de larvas (n=30) con una balanza analítica (Sartorius, Gottingen, Germany; precisión  $1 \times 10^{-4}$  g).

### **2.2.1. Preparación de extractos enzimáticos**

Los extractos enzimáticos se obtuvieron al macerar las muestras de eleuteroembriones (larvas recién eclosionadas), larvas y juveniles. En larvas mayores a 18 dpe se disecó el sistema digestivo con el propósito de eliminar los inhibidores enzimáticos que pudieran estar presentes en la musculatura, así como otras enzimas relacionadas con el metabolismo de las proteínas musculares y el sistema inmune (Hjelmeland, 1995).

En este caso, las disecciones se realizaron bajo un microscopio estereoscópico y de una lámpara con lupa sobre portaobjetos enfriados en una cama de hielo seco, con el fin de mantener las larvas a baja temperatura durante la disección. Cada muestra proveniente de la disección contuvo de 10 a 30 larvas (0-16 dpe) o de tres a cinco sistemas digestivos (a partir del día 18 dpe) se homogenizó en 1 ml de agua desionizada y en baño de hielo (4 °C) utilizando un homogenizador de tejidos (Kontes, USA). Los homogenizados se centrifugaron a 14000 g durante 30 min a 4 °C, en una centrífuga refrigerada (Biofuge Primo R marca Heraeus). El sobrenadante se utilizó como extracto enzimático y se separó en alícuotas de 200 µl que se almacenaron a -70 °C hasta su análisis (Figura 7).

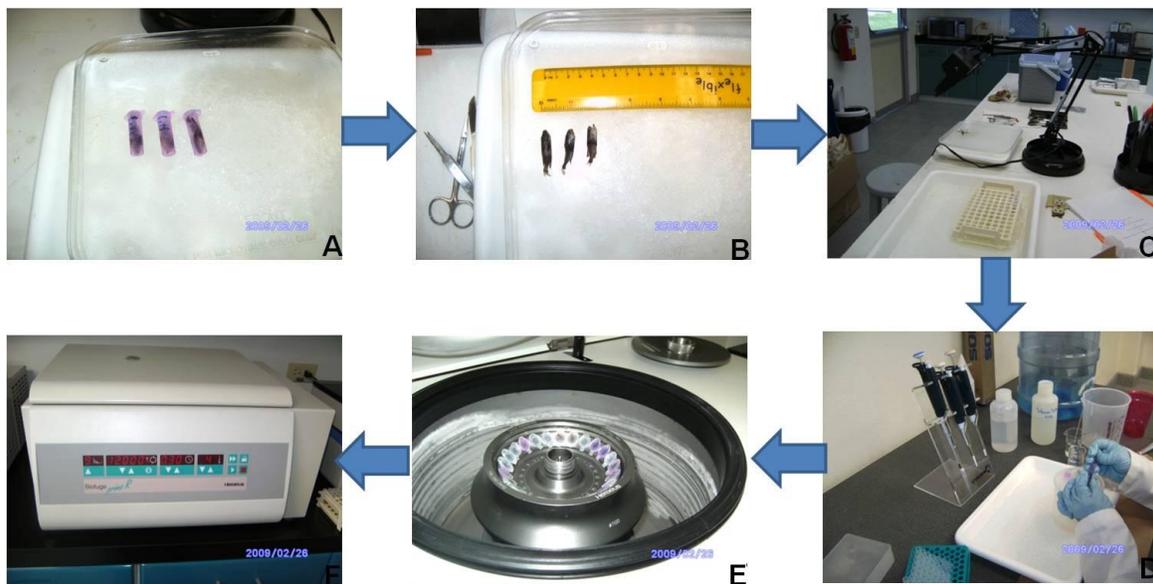


Figura 7. Procedimiento utilizado para la obtención del extracto enzimático en larvas de totoaba, corvina y pargo lunarejo. (A) forma de almacenamiento de larvas en estudio en tubos ependorf., (B) muestras de larvas preparadas para diseccionar su tracto digestivo en cama de hielo seco., (C) materiales utilizados para la disección., (D) maceración de muestras para la obtención del extracto

enzimático., (E y F) Acomodo de muestras eb centrifuga refrigerada para la obtención del extracto enzimático.

### **2.2.2. Determinación de proteína soluble**

La concentración de proteína soluble de cada muestra se determinó por triplicado de acuerdo a Bradford (1976), utilizando un kit de Bio-Rad. A 5  $\mu$ l de extracto problema se le añadió 1 ml de reactivo de Bradford y se agitó en vórtex. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, después de lo cual se leyó la absorbancia de las muestras a 595 nm contra un blanco sin extracto utilizando un espectrofotómetro uv/visible HACH-D/4000U (USA), usando como estándar una solución de albúmina bovina ( $1\text{mg ml}^{-1}$ ).

### **2.2.3. Cuantificación de la actividad proteolítica**

La Tabla II indica los sustratos utilizados para cuantificar por medio de espectrofotometría la actividad de algunas enzimas proteolíticas presentes en los extractos larvarios. A continuación se describe brevemente la metodología empleada.

**Actividad proteolítica ácida total (pepsina):** Para la medición de la actividad proteolítica ácida se utilizó una modificación de la metodología de Sarath *et al.* (1989). Se añadieron 150  $\mu$ l de hemoglobina desnaturalizada a 50  $\mu$ l de extracto enzimático y la mezcla se incubó a 37 °C durante 10 min, después de los cuales la reacción se detuvo con 300  $\mu$ l de ácido tricloroacético al 5% y se dejó reposar durante 30 min a 4 °C.

La proteína precipitada se eliminó por centrifugación a 19000 *g* durante 5 min y la absorbancia del sobrenadante se midió a 280 nm contra un blanco en el cual el extracto enzimático se inactivó por adición del ácido antes de iniciar la reacción. Se utilizó pepsina porcina comercial (SIGMA) a una concentración de 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  como control. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que catalizó la formación de 1  $\mu\text{g}$  de tirosina por minuto.

**Actividad tipo tripsina:** Para la medición de la actividad tipo tripsina se utilizó una modificación de la metodología de Erlanger *et al.* (1961). Se le añadieron 350  $\mu\text{l}$  de BAPNA (N $\alpha$ -Benzoil-DL-Arginina-P-Nitroanilida) a 50  $\mu\text{l}$  del extracto enzimático y la mezcla se incubó a 37 °C durante 30-60 min; al término de este tiempo la reacción se detuvo con 100  $\mu\text{l}$  de ácido acético al 30% y se dejó reposar durante 15 min a temperatura ambiente. La absorbancia a 410 nm se leyó contra un blanco en el cual el extracto enzimático se inactivó por adición previa del ácido. Se utilizó como control tripsina comercial (SIGMA Tipo IX, de páncreas de porcino), con una concentración de reacción de 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Una unidad de actividad corresponde a 1  $\mu\text{mol}$  de p-nitroanilida liberada por minuto usando como coeficiente de extinción molar 8800  $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  (Dimes *et al.*, 1994).

**Actividad tipo quimotripsina:** Para la medición de la actividad tipo quimotripsina se utilizó la metodología de Hummel (1959) con las modificaciones realizadas por Applebaum *et al.* (2001). La cantidad de extracto enzimático necesaria para detectar actividad (5-50  $\mu\text{l}$ ) se llevó a un volumen final de 50  $\mu\text{l}$  con agua desionizada. La reacción se inició al añadir 450  $\mu\text{l}$  de BTEE (N-Benzoil-L-Tirosina

Etil Ester) y la muestra se incubó por 15-30 min a 37 °C. La absorbancia a 256 nm se leyó contra un blanco en el cual el extracto enzimático se sustituyó con agua desionizada, usando como control quimotripsina comercial (SIGMA Tipo II, de páncreas de bovino) en una concentración de reacción de 1 µg ml<sup>-1</sup>. Una unidad de actividad enzimática se definió como 1 µmol de BTEE hidrolizado por minuto utilizando el coeficiente de extinción molar 964 cm<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>.

#### **2.2.4. Cálculo de actividades específicas.**

La actividad de un extracto problema se determinó utilizando las siguientes ecuaciones:

**Ecuación 1.** Cálculo de la actividad en unidades por ml.

$$\text{Unidades/ml} = \frac{\Delta \text{ABS} \times \text{volumen final}_{\text{reacción}} \text{ (ml)}}{\text{CEM} \times \text{tiempo (min)} \times \text{volumen extracto (ml)}}$$

**Ecuación 2.** Cálculo de la actividad en unidades por mg de proteína soluble en el extracto.

$$\text{Unidades/mg proteína soluble} = \frac{\text{Unidades / ml}}{\text{mg proteína soluble / ml}}$$

**Ecuación 3.** Cálculo de la actividad en unidades por larva.

$$\text{Unidades / larva} = \frac{\text{Unidades / ml}}{n^{\circ} \text{ larvas / ml}}$$

Siendo:

ΔABS el incremento de absorbancia a una determina longitud de onda; volumen final<sub>reacción</sub>, el volumen final de la reacción; CEM, el coeficiente de extinción molar.

Tabla II. Sustratos utilizados para cuantificar espectrofotométricamente la actividad de diferentes enzimas digestivas en larvas de totoaba, corvina y pargo.

<b>Sustrato</b>	<b>Especificidad</b>	<b>Solvente</b>
<b>Generales:</b>		
Hemoglobina (desnaturalizada) <sup>1</sup>	2% Proteasas ácidas (pepsina)	
*Almidón	$\alpha$ -Amilasa	
<b>Específicos:</b>		
BAPNA 1 mM <sup>2</sup>	Tipo tripsina	DMSO
BTEE 0.56 mM <sup>3</sup>	Tipo quimiotripsina	DMSO
*Leu-p-nitro 1.2 mM <sup>4</sup>	Tipo Leucin-Aminopeptidasa	DMSO

<sup>1</sup> Metodología de Sarath *et al.* (1989).

<sup>2</sup> BAPNA: N $\alpha$ -Benzoil-DL-Arginina-P-Nitroanilida. Metodología de Erlanger *et al.* (1961).

<sup>3</sup> BTEE: N- Benzoil-L-Tirosina Etil Ester. Metodología de Hummel (1959) modificada por Applebaum (2001).

<sup>4</sup> Leu-p-nitro: L-leucin-P-nitroanilida. Metodología de Appel (1974).

\* Solamente se analizaron en muestras de larvas de corvina blanca.

### **2.2.5. Análisis histológico**

Para el estudio del desarrollo del sistema digestivo se usaron números de larvas diferentes de acuerdo a edad y tamaño, que fueron fijadas por 24 horas en solución de paraformaldehído al 2% (preparado en solución amortiguadora de fosfatos, PBS). Fueron lavadas con agua destilada y posteriormente almacenadas en etanol 70% a 4 °C hasta su procesado.

Las muestras se deshidrataron en soluciones sucesivas de etanol, benceno y finalmente se incluyeron en parafina en un deshidratador de tejidos automático Leica TP 1040 en el laboratorio de histología de la Facultad de Ciencias en la Universidad Autónoma de Baja California, Campus Ensenada. Los bloques de parafina se cortaron sagitalmente en un micrótopo convencional (Leica-RM 2125 RT) en láminas de 4 y 5  $\mu\text{m}$  de espesor, que se desparafinaron, rehidrataron en soluciones sucesivas de xileno, etanol y agua destilada y se tiñeron con hematoxilina-eosina (Humanson 1979). Las láminas se fotografiaron en una cámara digital PAXcam2 (Pax-it versión 6, Mis Inc., USA) software conectada a un microscopio BH-2 Olympus (Japón), para posteriormente realizar la descripción del desarrollo del sistema digestivo de las larvas (Figura 8).

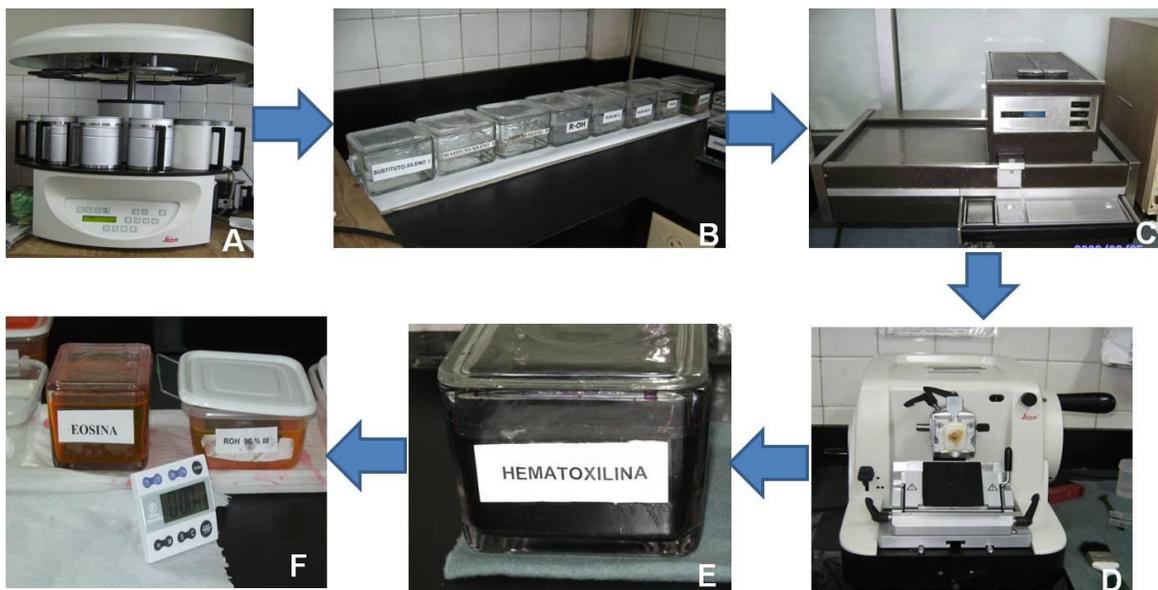


Figura 8. Procedimiento histológico utilizado para la realización del desarrollo del sistema digestivo en larvas de totoaba, corvina y pargo lunarejo. (A) Histoquinete

utilizado para la deshidratación., (B) técnica de desparafinación., (C) equipo utilizado para embeber muestras en parafina líquida., (D) micrótomo convencional utilizado para realizar cortes de 4 y 5  $\mu\text{m}$ ., (E y F) colorantes utilizados para la tinción de células y tejidos de las muestras.

## **2.2.6. Análisis molecular**

### **2.2.6.1. Clonación de genes de enzimas digestivas en larvas de totoaba**

El análisis molecular se realizó según la metodología descrita por García-Gasca *et al.* (2006). El ARN total fue extraído de larvas completas (hasta el dpe 16) y de tracto digestivo (desde el dpe 18 hasta el final del estudio), usando reactivo Trizol (Invitrogen), seguido por dos tratamientos de DNAsa para eliminar completamente el ADN genómico. La síntesis de ADNc se llevó a cabo con 5  $\mu\text{g}$  de ARN total y la enzima transcriptasa reversa MMLV (Promega) en presencia de random primers.

Para el diseño de los oligos para los genes de las diferentes enzimas se obtuvieron secuencias de nucleótidos de las diferentes enzimas para otras especies de peces usando el programa ENTREZ del NCBI (National Center of Biotechnology Information) a partir del cual fue posible ingresar a la base de datos de GenBank. Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa Multalin o Clustal-W. Se obtuvieron secuencias consenso de regiones conservadas para diseñar los oligos degenerados. Estos oligos se diseñaron utilizando el programa PRIMER3.

A partir de estos oligos se realizaron amplificaciones por PCR utilizando ADNc y los productos obtenidos fueron purificados y ligados a un vector pGEM-T

(Promega), introducidos en bacterias competentes *E. coli* DH5 $\alpha$  y fueron transformados por choque térmico; la extracción del plásmido se realizó mediante lisis alcalina. La secuenciación bidireccional se llevó a cabo utilizando primers universales para secuenciación T7/SP6 (T7: 5'-TAA-TAC-GAC-TCA-CTA-TAG-GG-3'; SP6: 5'-ATT-TAG-GTG-ACA-CTA-TAG-3') y un secuenciador LICOR IR<sup>2</sup> siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con otras secuencias en base de datos del GenBank mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y editadas mediante el programa BioEdit. Posteriormente se diseñaron oligos específicos para cada enzima para proceder a la cuantificación de la expresión génica por PCR en tiempo real.

#### **2.2.6.2. PCR Cuantitativo (qPCR).**

La expresión de genes de tripsina, quimotripsina, pepsina y 18s ribosomal fue cuantificada de manera relativa con un termociclador de tiempo real SmartCycler (Cepheid) usando SYBER GREEN®. Las muestras de ADNc de larvas de totoaba de los diferentes días post eclosión fueron analizadas por duplicado y se utilizó como control interno el gen 18s ribosomal (los primers para qPCR se muestran en la Tabla IV). Las reacciones de PCR se realizaron bajo las siguientes condiciones: 95 °C por 2.5 minutos, y 40 ciclos a 95 °C por 30s, 60 °C por 30s y 72 °C por 30s. La elaboración de la curva estándar de cada uno de los genes se realizó por medio de diluciones seriadas del ADNc amplificado con los primers de tripsina, quimotripsina, pepsina y 18s ARNr. Se utilizaron los valores del ciclo umbral ( $C_T$ ) y el número de copias en escala logarítmica (log copy

number) obtenidos del análisis de dilución serial para realizar un análisis de regresión lineal y calcular cada una de las curvas estándar.

Para el cálculo del número de copias ( $C_0$ ) en muestras no conocidas se empleó el modelo de regresión lineal:

$$y = a + b (C_T)$$

Donde:

$y$ = nivel de expresión de cada gen,  $a$ = intercepto,  $b$ = pendiente de la curva estándar y  $C_T$ = ciclo umbral.

Finalmente para normalizar la  $C_0$  de cada muestra se dividió la  $C_0$  de cada uno de los genes por el  $C_0$  de 18s rRNA y por último cada muestra normalizada se dividió por el calibrador que en este caso fue el día post eclosión uno (dpe 1).

### **2.3. Análisis estadístico**

La actividad específica e individual de las enzimas digestivas en larvas fue expresado como media y desviación estándar (media  $\pm$ D.E). Todos los datos fueron analizados para su normalidad y homogeneidad de varianzas. Se realizaron pruebas de análisis de varianzas de una vía (ANOVA), identificando las diferencias con pruebas de comparaciones múltiples de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Sigma-Plot 11.0 para Windows (Sigma- Plot® 11.0, USA). Todas las pruebas estadísticas se realizaron con un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ .

## 2.4. Resultados

### 2.4.1. Crecimiento larvario.

El crecimiento en peso húmedo (mg) y longitud total (mm) se muestra en la Figura 9. Durante el cultivo experimental se observó que desde el dpe 1 hasta el dpe 14 el crecimiento en peso fue muy lento, sin embargo, a partir del dpe 16 se observó un incremento en forma exponencial hasta el final del experimento (dpe 40). El crecimiento en longitud total fue similar durante los primeros 10 días, incrementándose en forma exponencial a partir del dpe 12, manteniéndose así hasta el final del experimento.

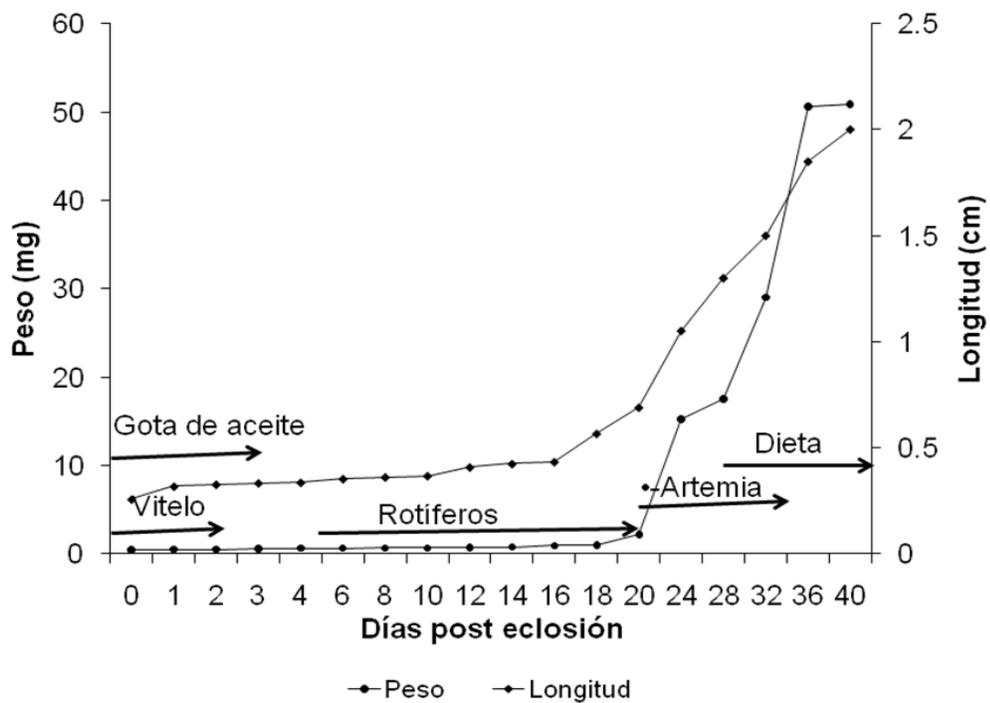


Figura 9. Longitud y peso de grupo de larvas de totoaba (cm, mg larva  $\pm$  D.E.,

n=3). Con flechas se indica el tipo de alimento que se proporciono durante ese periodo.

#### **2.4.2. Desarrollo del sistema digestivo**

Al momento de la eclosión las larvas de totoaba presentaron características muy similares a otras especies de peces marinos (Figura 10A), el tracto digestivo (td) es un tubo sencillo con células indiferenciadas que descansa dorsalmente sobre el saco vitelino (sv). Para el día 3 y 4 (Figura 10B) el ojo empezó a desarrollarse, así mismo la boca estaba abierta, sin embargo aun existía presencia de saco vitelino, gota de aceite y el ano estaba cerrado, lo que indica que la larva aun no está preparada para su primera alimentación exógena. Para el día 10 (Figura 10C) diferentes órganos están desarrollados, el intestino anterior y posterior están diferenciados y el ano estaba abierto. En este día (dpe 10) la larva se alimentó con rotíferos enriquecidos con una emulsión de ácidos grasos.

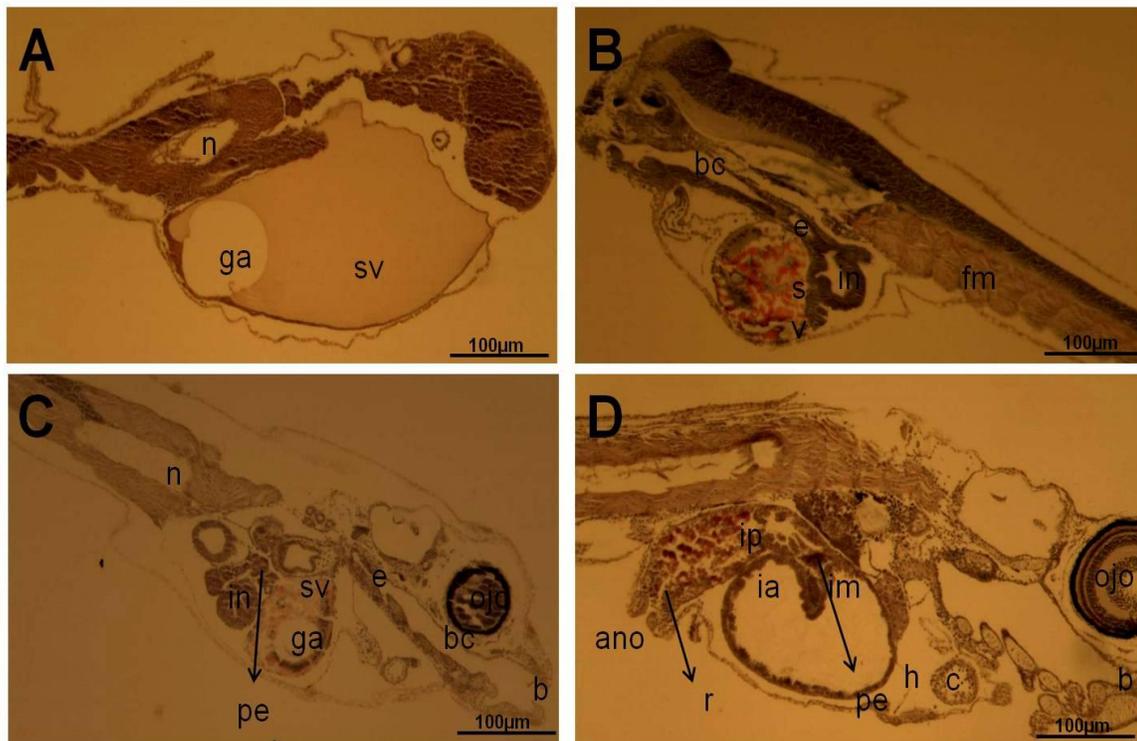


Figura 10. Secciones sagitales de larvas de totoaba. (A) dpe 1, (B) dpe 3, (C) dpe 4 y (D) dpe 12. Abreviaciones. (b) boca, (bc) bucofaringe, (c) corazón, (e) esófago, (fm) fibras musculares, (ga) gota de aceite, (h) hígado, (ia) intestino anterior, (im) medio, (ip) posterior, (n) notocordio, (pe) páncreas exocrino, (r) recto, (sv) saco vitelino, (V) vejiga.

En el dpe 18 (Figura 11A), órganos como intestinos, páncreas exocrino, hígado, vejiga natatoria, esófago y corazón estaban completamente desarrollados, así mismo, se observó como los intestinos tenían un doblamiento en forma de lazo (loop). El día 24 (Figura 11B) se presentaron cambios morfológicos importantes en el desarrollo de las larvas entre los que destacan el desarrollo completo del hígado, así como el desarrollo del estómago, sin embargo no se diferenciaron glándulas gástricas en esta fase. El dpe 28 (Figura 11C) se observó un estómago

completamente desarrollado con presencia de glándulas gástricas, así mismo, se observó inclusión de vacuolas lipídicas en el hígado (Figura 11D).

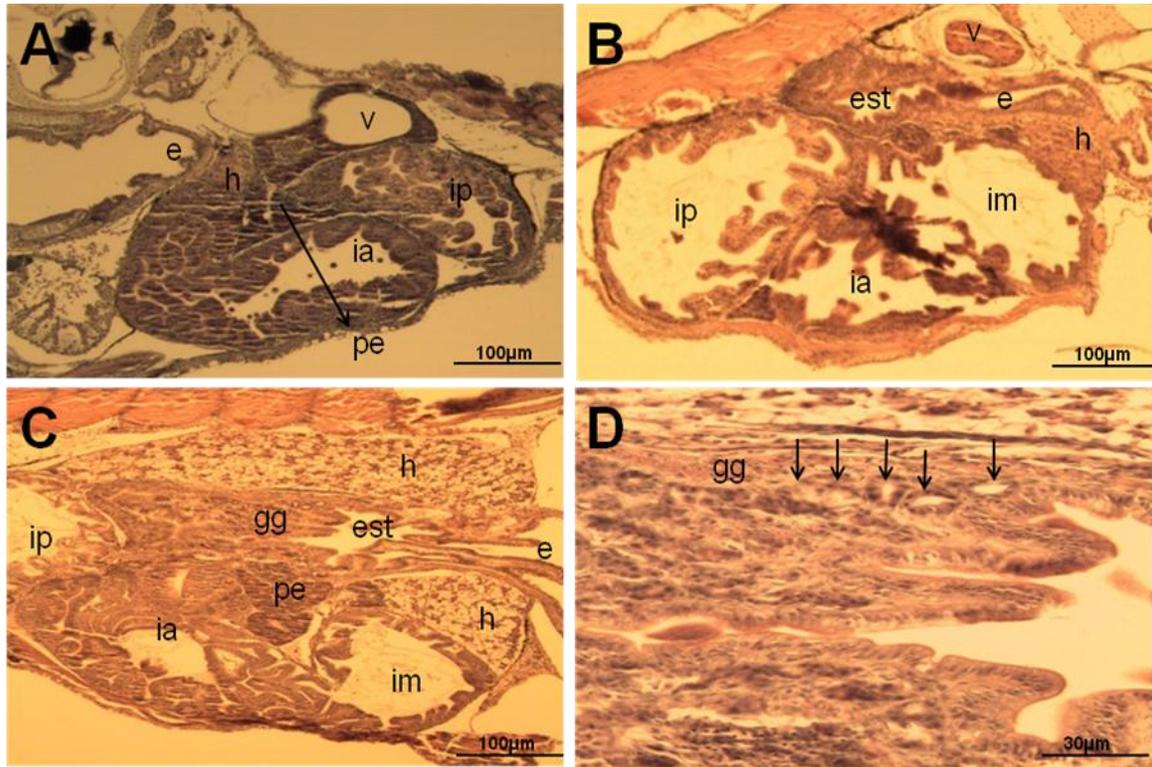


Figura 11. Secciones sagitales del sistema digestivo de larvas de totoaba. (A) dpe 18, (B) dpe 24, (C) dpe 28, (D) acercamiento del estómago donde se observan las glándulas gástricas (gg) indicadas por flechas en en la Figura D. (e), esófago, (est), estómago, (h) hígado, (ia) intestino anterior, (im) intestino medio, (ip) intestino posterior, (pe), páncreas, (v), vejiga gaseosa.

En el dpe 32 se observó mediante un corte transversal cómo el estómago presenta glándulas gástricas alrededor de todo su pliegue (Figura 12A), mientras que el número de células caliciformes incrementó al término del esófago (Figura 12B). En el dpe 36 (Figura 12C) y dpe 40 (Figura 12D) se observaron los ciegos pilóricos rudimentarios alrededor del estómago y el nivel de lípidos y glucógenos

depositados en el hígado continúan incrementándose hasta el final del estudio en el dpe 40. Así mismo, se observaron numerosas vacuolas lipídicas en el hígado que posiblemente servirán como depósito de glucógeno y lípidos.

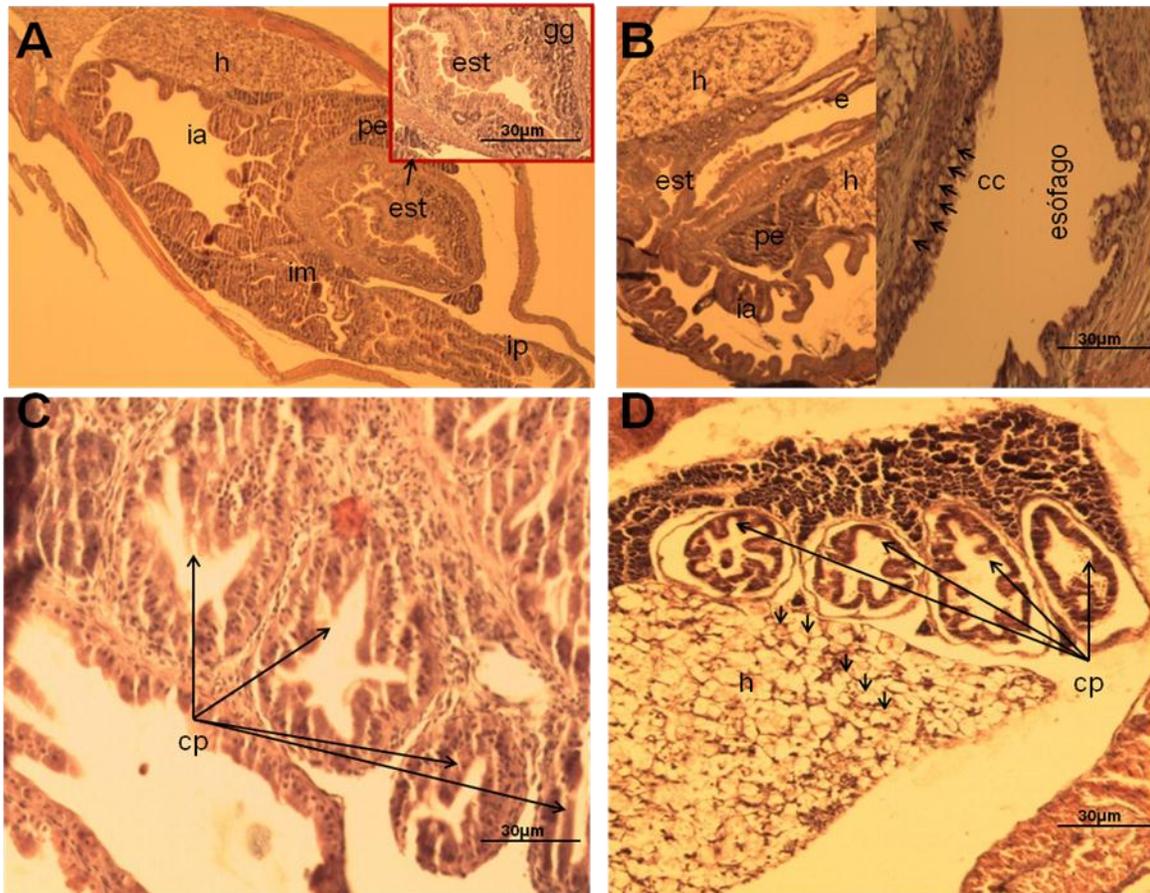


Figura 12. Secciones sagitales del sistema digestivo de larvas de totoaba. (A) dpe 32, (B) acercamiento del esófago donde se observan células caliciformes (cc), (C) dpe 36 se observan ciegos pilóricos (cp) y dpe 40, (D) acercamiento de los ciegos pilóricos (cp) y vacuolas lipídicas (vl) en el hígado (vl). Las flechas en la Figura B indican células caliciformes, en la Figuras C y D indican glándulas gástricas y ciegos pilóricos respectivamente, (cc), células caliciformes, (cp), ciegos pilóricos, (e), Esófago, (est), estómago, (gg), glándulas gástricas, (h) hígado, (ia) intestino anterior, (im) intestino medio, (ip) intestino posterior, posterior, (pe), páncreas exocrino, (v), vejiga gaseosa.

**2.4.3. Clonación y secuenciación parcial de las enzimas digestivas tripsina, pepsina y quimotripsina.**

Se obtuvieron secuencias parciales de enzimas de totoaba, estas se sometieron al banco de genes Genbank (Tabla III).

**Tabla III. Secuencias nucleotídicas parciales de enzimas digestivas obtenidas de larvas de totoaba.**

---

**> TRIPSINA (314 nucleotidos) Genbank HM754480**

---

ACATTGACATCATGCTGATCAAGCTGAGCAAGCCCGCCACCCTGAACAGCTA  
CGTCCGCACCGTGTCCCTGGCCTCCAGCTGTGCAGCTGCTGGCACCCGCTGT  
CTGATCTCTGGATGGGGCAACACCAGCAGCTCTGGAAGCAACTACCCTGATC  
GTCTGAGGTGCCTGGATGCCCCATCCTGAGCGACAGCAGCTGCAGGACTGC  
CTACTGTGGACAGATCACTCACAACATGTTCTGTTCTGGATTTGTTCGAGAGA  
GGCAAAGACTCCTGGCGCGGTGGCGCTGTTGTCTCCGGGGTGTGCGTTGGTC  
GG

---

**> PEPSINA (450 nucleotidos) GenBank HM754482**

---

GGGGCgACCAGCCTCTGTCCATCCAGTACGCAGCTGgCAGCATGAccgGATA  
TCTGGGCAGCGACATTGTTGAGGTGCGACGCATCTCTGTGAACAACCAGGTG  
TGTGGTTTTACGCGACTCAGAGGCTCTCCTACATGCTCACATGCACGCTGATG  
GTATCCTGGGACTGGCTCTCCAGTCCAATGCCTCTGACGATGTTGTGCCAGT  
CTTTGACAACATGATCAGCCAGCACCTGGTGTACAGACCCTGTTCTCTGTGTC  
TACCTGAGCAGCAACAGTCAGCAGGGCAATGAGGTGCTCTCCGGTGGTATTG  
ACAGCAACTACTACTGGACAAATTACCTGGATCCCTCTGACCTCTGCCAC  
CTACTGGCAGATCAAAATGGACAGTGTTACCATCAATGGACAGACTGTGGCC  
TGCTCTGATGGTTGCGAGGCCATCATCGACAATC

---

**> QUIMOTRIPSINA (477 nucleotidos) GenBank HM754481**

---

CTGGCCATGGCAGGTGTCTCTGCAGCAATCCAATGGCTTCTACTTCTGTGGA  
GGATCTCTGATCAACGAGAACTGGGTGGTGACCGCCGCTCACTGTAACGTCA  
GGACCTACCACCGTGTGGTTCGCTGGAGAACACATCAAGGGCTACGGCTCCAA

CGAGCACGTCAAGGTTCTGAAGCCCGCCAAAGTGTTACCCACCCCTACTGG  
AACCCCCACACAATCAACAACGACATCTCCCTCATCAAGTTGTCCACCCCG  
CCCGCCTGGGCACAAACGTGTCCCCTGTCTGCCTCGCCGAGTCCCCCGATGT  
CTTTTCCGCCGGATGGACCTGCGTCAACTCCGGCTGGGGTCTGACCCGCTAC  
AACGCTCCCAGTACTCCCAACACACTCCAGCAGGGCGCCCTGCCCCTGCTGT  
CCAACGAGCAGTGCAAGAAACACTGGGGCAGCAACATCTCCGGAATCATGAT  
TTGTGCTGG

---

**> 18s RIBOSOMAL (443 nucleotidos) GenBank HM754483**

---

ATAAAATTCAGCTGCCATAGCGGATCTTGATATCGCTGCAGTTAAACAAC  
CGTAGTTGGATCTCGGGATCGAGCCGTCGAACAGCCGCCGGGCCGACCACCG  
TCTGTCCCAGCCCCTGCCTCTCGGCGCCCCTACGATGCTCTTAGCTGAGTGT  
GCCGCGCGGTCCGAAGCGTCTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAACCAGG  
CGCCGTCGCCAGTAAACCGCAGCTACGAATATTGGAATAGAACTCCGGTTCT  
ATTTTGTGGGTTTTCTTCTCTGAACTGGGGCCATGATTAAGAGGGACGCCCG  
GGGGCATTTCGTATTGTGCGGCTAGAGGTGAAATTCTTGACCCGGCAGAAGAC  
GGACGAAAGCGAAAGCATTGCGCAAGAATGTTTTTCATAATTCAAGAACGAAA  
GTCGGAGGTTTCAAGACGATCAGATACTGTCGTAGTTCCGATCATCA

A partir de estas secuencias se diseñaron los siguientes oligos específicos por medio del programa PRIMER3, para amplificarlas por tiempo real (Tabla IV).

Tabla IV. Primers específicos para los genes (tripsina, quimotripsina, pepsina y 18s ribosomal) de totoaba.

Primers específicos		Número de acceso
TotoTryp	F5'ACC CGC TGT CTG ATCT CTG GAT 3'	HM754480
TotoTryp	R5'TTG TCG AGA GAG GCA AAG ACT CCT 3'	
TotoChemo	F5'CGC TCA CTG TAA CGT CAG GAC CTA 3'	HM754481
TotoChemo	R5'GGT GGA CAA CTT GAT GAG GGA GAT 3'	
TotoPepsin	F5'CTC TGA CGA TGT TGT GCC AGT CTT 3'	HM754482
TotoPepsin	R5'CAG AGG TCA GAG GGA TCC AGG TAA 3'	
Toto18sRib	F5'CTG AAC TGG GGC CAT GAT TAA GAG 3'	HM754483
Toto18sRib	R5'GTC TTC GAA CCT CCG ACT TTC GTT 5'	

## 2.5. Expresión y actividad de enzimas digestivas

### 2.5.1 Tripsina

La expresión de mRNA de tripsina se detectó a niveles muy bajos durante el dpe 1, sin embargo, hacia el dpe 5 la expresión incrementó, la cual coincidió con el inicio de la alimentación a base de rotíferos enriquecidos con ácidos grasos (Figura 13A). El nivel de expresión volvió a incrementar en el dpe 16 cuando la alimentación cambió de rotíferos a nauplios de *Artemia*, así mismo, en este periodo órganos del sistema digestivo como páncreas, intestinos, hígado entre otros se observaron completamente desarrollados, sin embargo, no se observaron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) al dpe 16 con respecto a los demás días.

El máximo nivel de mRNA de tripsina fue detectado en el dpe 34, cuando las glándulas gástricas y el estómago estaban completamente desarrollados y las larvas fueron alimentadas exclusivamente con microdieta. En el dpe 40 (al final del experimento), una disminución muy marcada mas no significativa ( $P>0.05$ ) en el nivel de expresión del gen de tripsina fue observada (Figura 13A).

La actividad específica de tripsina fue detectada desde el dpe 1 ( $0.39 \pm 0.05$  mU/mg proteína), manteniéndose baja durante los siguientes días, sin embargo, un incremento significativo ( $P<0.001$ ) fue observado en el dpe 12 ( $1.06 \pm 0.20$  mU/mg proteína). Después de ese día, la actividad específica de tripsina disminuyó en el dpe 16 ( $0.39 \pm 0.01$  mU/mg proteína), incrementando de nuevo en el dpe 25 ( $0.99 \pm 0.17$  mU/mg proteína  $P<0.001$ ), sin embargo, el nivel de actividad específica de tripsina volvió a disminuir durante los siguientes días donde no se observaron diferencias significativas ( $P= 0.999$ ) en la actividad enzimática cuando las larvas fueron alimentadas a base de rotíferos y *Artemia*. El máximo nivel de actividad específica de tripsina alcanzó su máximo nivel el dpe 40 ( $1.83 \pm 0.05$  mU/mg proteína) (Figura 13B).

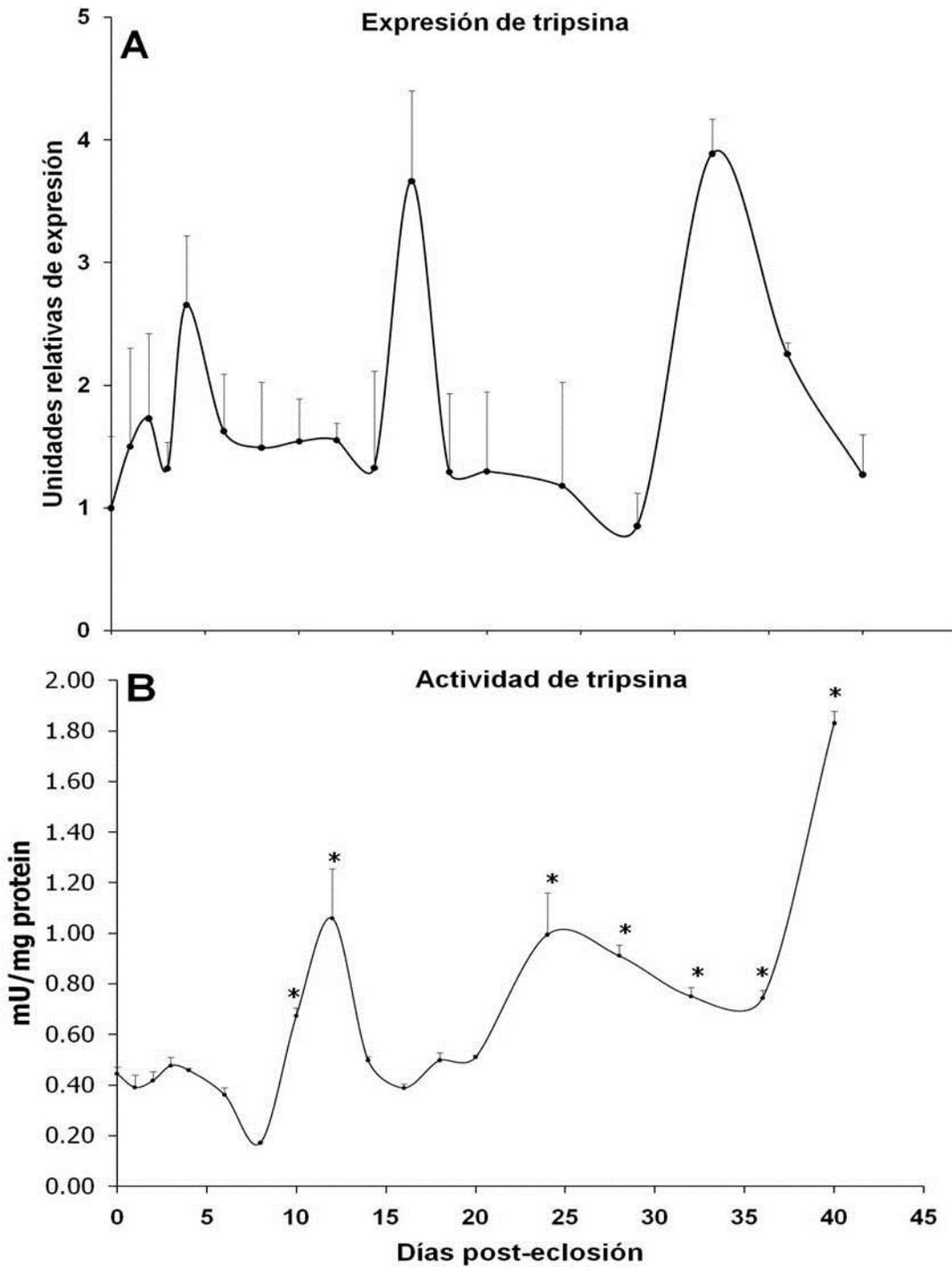


Figura 13. Expresión y actividad de tripsina en larvas de totoaba durante su desarrollo larvario (Media  $\pm$  DE, n=3). Asteriscos (\*) indican diferencias significativas en el tiempo.

### **2.5.2 Quimotripsina**

La expresión de quimotripsina fue detectada a nivel muy bajo en el dpe 1, mostrando dos incrementos importantes durante el desarrollo del presente estudio, sin embargo dichos incrementos no fueron significativos ( $P > 0.05$ ). El primer incremento fue observado en el dpe 16 (Figura 14A), coincidiendo con el cambio de alimentación de rotíferos enriquecidos a nauplios de *Artemia* enriquecidos. El segundo incremento fue observado en el dpe 36, cuando las larvas fueron alimentadas con microdieta como dieta exclusiva, luego el nivel de expresión de quimotripsina disminuyó hacia el final del estudio al dpe 40.

Diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) fueron observadas en la actividad específica de quimotripsina (Figura 14B), la cual se detectó a un nivel muy bajo en el dpe 1 ( $0.18 \pm 0.08 \text{ mU} \times 10^{-3} / \text{mg proteína}$ ), incrementando significativamente ( $P < 0.001$ ) en el dpe 12 ( $2.57 \pm 0.38 \text{ mU} \times 10^{-3} / \text{mg proteína}$ ), coincidiendo con la alimentación a base de rotíferos enriquecidos con ácidos grasos y con el desarrollo del intestino. No se observaron diferencias significativas entre los días 12 y 36 ( $P = 0.805$ ). Sin embargo, un incremento significativo fue observado en el dpe 36 ( $1.75 \pm 0.95 \text{ mU} \times 10^{-3} / \text{mg proteína}$ ) ( $P < 0.001$ ). En este periodo las larvas estaban por terminar la transición de alimento vivo a inerte. En el dpe 40 la actividad de quimotripsina disminuyó significativamente ( $P < 0.001$ ) con respecto a los dpe 12 y 36 (Figura 14B)

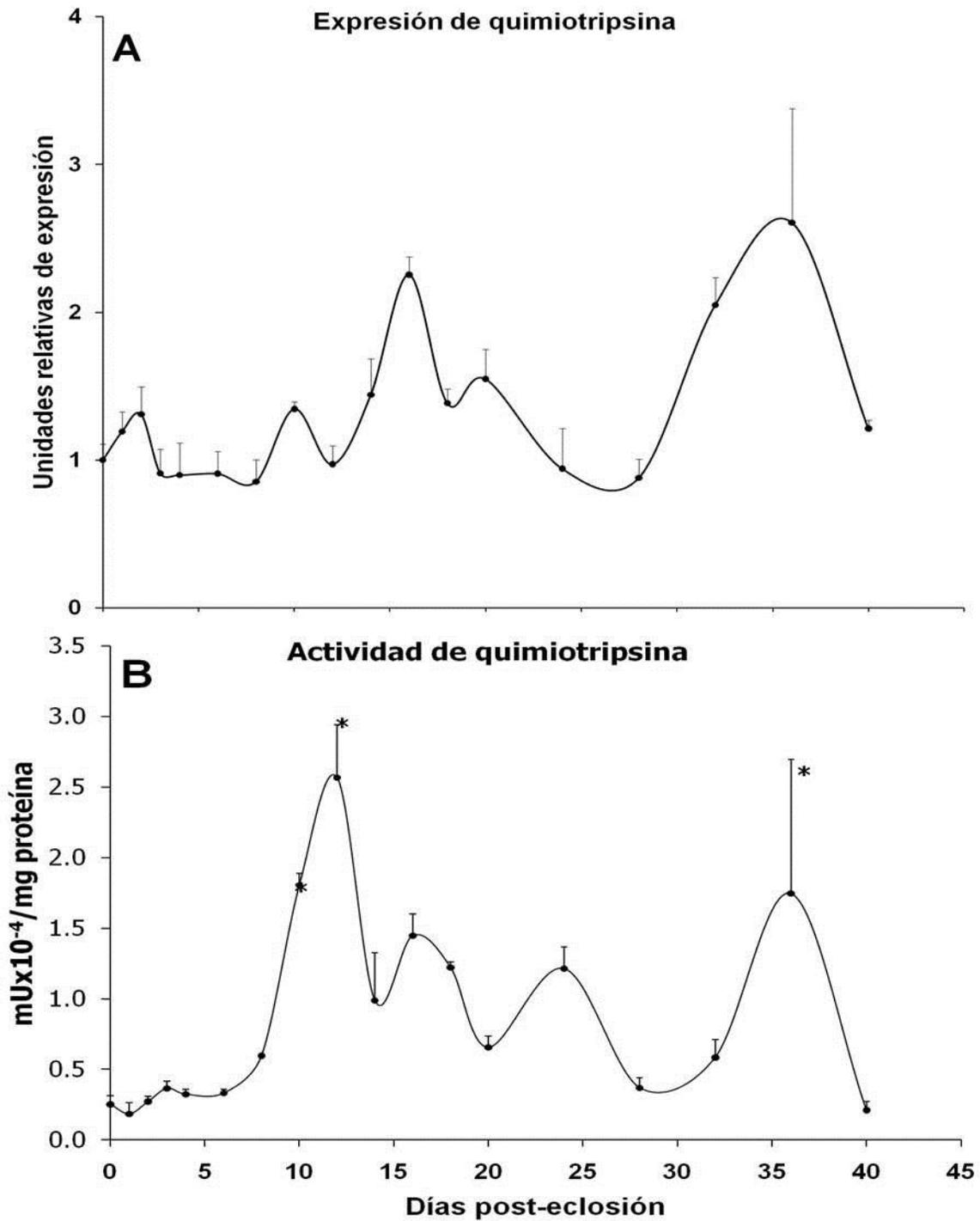


Figura 14. Expresión y actividad de quimi tripsina en larvas de totoaba durante su desarrollo larvario (Media  $\pm$ DE n=3). \* indican diferencias significativas en el tiempo.

### **2.5.3 Pepsina**

La expresión del gen de pepsina fue detectada significativamente en el dpe 16, dos días antes de la aparición de las glándulas gástricas (Figura 15A). El máximo nivel de expresión de pepsina incrementó significativamente en el dpe 36 ( $P=0.025$ ), coincidiendo con el desarrollo completo del estómago. Después del dpe 36 y hasta el dpe 40 (etapa final del bioensayo) el nivel de expresión disminuyó, etapa final del bioensayo (Figura 15A).

La actividad específica de pepsina fue detectada a niveles muy bajos entre los dpe 18 y 20 ( $0.20\pm 0.07$  U/mg proteína). El primer incremento significativo en actividad específica fue observado el dpe 24 ( $2.16\pm 1.17$  U/mg proteína,  $P = 0.01$ ) coincidiendo con el inicio de la formación del estómago (Figura 15B). Posteriormente la actividad disminuyó entre los días 28 y 32 para luego incrementar significativamente ( $P < 0.01$ ) al final del experimento en el dpe 40. Sin embargo, la expresión de pepsina fue detectada a niveles bajos en el dpe 14, observándose un incremento no significativo ( $P = 0.715$ ) en el dpe 16, para luego disminuir en el dpe 25 y volver a incrementar significativamente ( $P = 0.025$ ) en el día 36 donde alcanzó su nivel máximo.

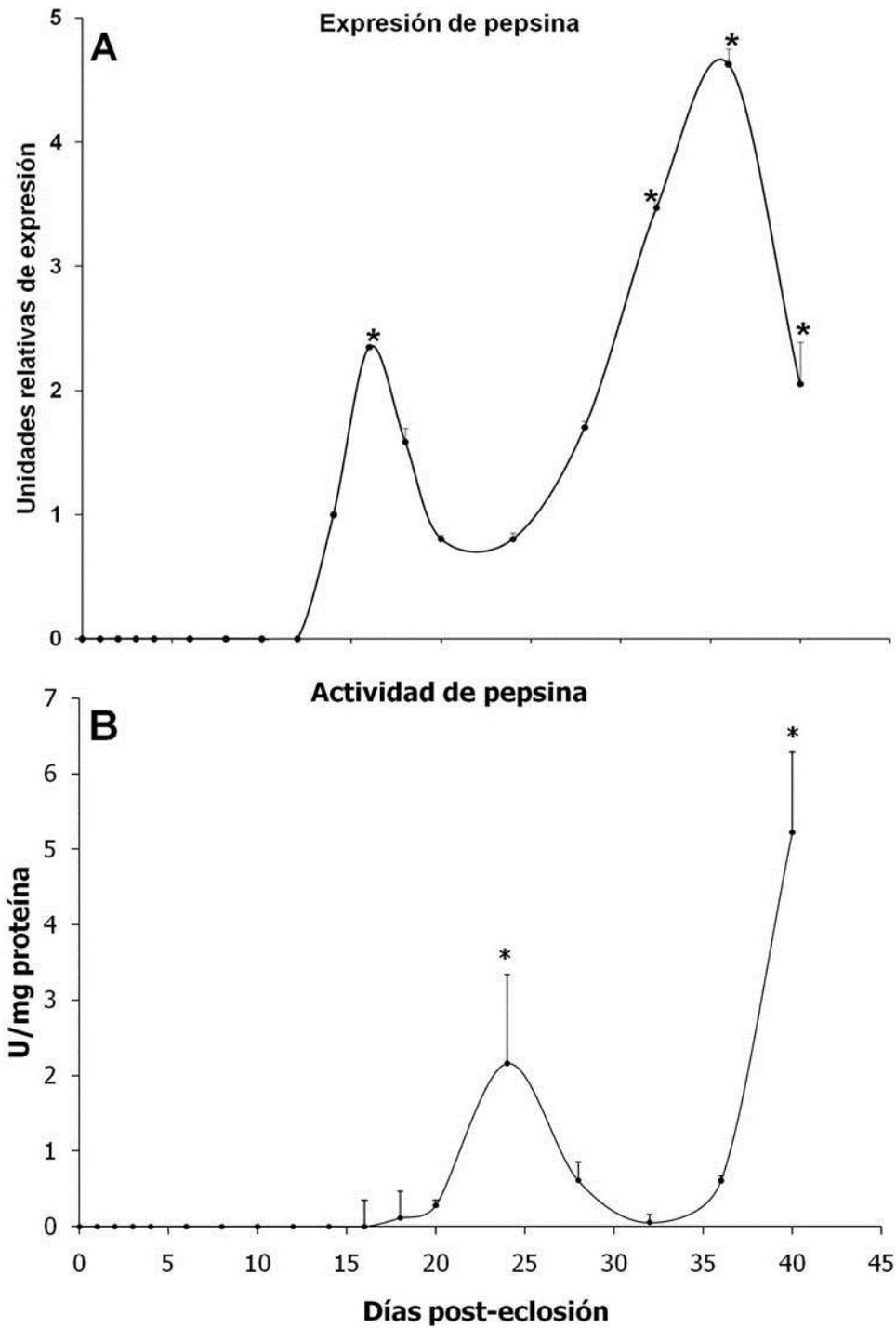


Figura 15. Expresión y actividad de pepsina en larvas de totoaba durante su desarrollo larvario (Media  $\pm$ DE n=3). \* Indican diferencias significativas en el tiempo.

## **2.6. Discusión**

Uno de los grandes retos de la acuicultura marina es la cría intensiva de larvas, operación sumamente importante para lograr el cultivo comercial de cualquier especie marina. Por lo que en la actualidad, los esfuerzos de investigación se han encaminado a determinar las condiciones óptimas de cultivo donde se incluyen condiciones ambientales inherentes a las larvas, que permitan incrementar su crecimiento y supervivencia.

Mediante estudios de fisiología de la nutrición en etapas larvarias, se ha adquirido el conocimiento para entender el progreso de las enzimas digestivas durante el desarrollo larval, por lo que se ha logrado la planificación de los modelos de alimentación y capacidades nutricionales de las larvas de diversos peces marinos (Díaz-López *et al.*, 1997; Zambonino-Infante *et al.*, 2001; Álvarez-González *et al.*, 2008). Es por ello que actualmente los estudios se basan en el conocimiento detallado de actividad y expresión enzimática digestiva de proteasas, lipasas, amilasas, fosfatasas, entre otras, durante la ontogenia de las larvas. Por lo anterior, es importante el contar con este conocimiento, ya que nos puede indicar el estado nutricional de la larva, de manera tal que los datos obtenidos pueden ser relevantes para establecer el momento preciso en que la larva será capaz de digerir de forma eficiente la dieta, y por lo tanto, determinar el momento óptimo para realizar el cambio de alimento vivo a microdieta (destete) (Ueberschär, 1993; Alarcón y Martínez, 1998).

El desarrollo del tracto digestivo, así como órganos accesorios en larvas de totoaba fue muy similar a otras especies marinas como *Diplodus sargus* (Ortiz-Delgado et al., 2003), *P. maculatofasciatus* (Peña et al., 2003), *S. annulatus* (García-Gasca et al., 2006), *D. labrax* (Giffard-Mena et al., 2006), corvina blanca *Atractoscion nobilis* (Galaviz et al., 2011), *L. guttatus* (Galaviz et al., aceptada) entre otras especies de peces marinos. En larvas de totoaba el desarrollo del tracto digestivo y órganos accesorios, entre ellos, la diferenciación de enterocitos, el plegamiento de la mucosa intestinal, la bucofaringe y el esófago fueron visibles entre los dpe 3-4. Resultados similares al presente estudio fueron observados en especies como *D. sargus*, *P. maculatofasciatus*, *A. nobilis*, entre otras. De acuerdo a Segner et al. (1994), la diferenciación de enterocitos son un indicador del funcionamiento del intestino, lo que indica que el organismo es capaz de absorber nutrientes al inicio de la primera alimentación exógena, así mismo, mencionan que el nivel de diferenciación de los enterocitos es similar a los de un organismo adulto.

El desarrollo del estómago en larvas de *T. macdonaldi* fue observado en el dpe 24, sin embargo, en el dpe 28 fueron observadas las primeras glándulas gástricas, lo que indica que esta especie puede digerir alimento formulado a partir de este día, sin embargo, es probable que glándulas gástricas puedan diferenciarse días antes del dpe 28. De acuerdo a Baglolle et al. (1997), el desarrollo de las glándulas gástricas se considera el último evento importante en el desarrollo del tracto digestivo y algunos autores sugieren su presencia como

una indicio del final del período larval, y quizá el inicio de la etapa juvenil (Tanaka, 1972; Bisbal y Bengtson, 1995; Sarasquete *et al.*, 1995; Peña *et al.*, 2003). El desarrollo completo del estómago funcional puede aumentar la capacidad digestiva del sistema gastrointestinal, debido a la producción de pepsina y ácido clorhídrico producido por las glándulas gástricas, que implica el establecimiento de digestión ácida y una digestión extracelular de proteínas más eficiente (Yufera y Darias, 2007), y por lo tanto, mejorar la digestión de las proteínas intracelulares que ocurren en el intestino posterior (Govoni *et al.*, 1986). Es por este motivo que el desarrollo completo del estómago juega un papel importante en la capacidad digestiva cuando la alimentación de las larvas cambia de alimento vivo a alimento inerte (Lee and Litvak, 1996; Falk-Petersen and Hansen, 2001).

La presencia de proteasas como tripsina y quimotripsina en las larvas de totoaba fueron detectadas en el dpe 1, evento que se ha demostrado posterior en especies como la dorada y la lubina (Moyano *et al.*, 1996; Zambonino-Infante y Cahu, 1994a; Zambonino-Infante *et al.*, 1996) mediante estudios con técnicas de digestibilidad *in vitro* de diferentes nutrientes. En relación con la aparición temprana de enzimas digestivas, al momento de la eclosión el páncreas de muchas de las larvas ésta bien desarrollado y sus células acinares (células secretoras de jugo pancreático) son funcionales, ya que han sido observados como zimógenos granulares que se supone son los precursores de la actividad de tripsina y quimotripsina (O'Connell, 1976; Govoni, 1980). Estos gránulos de zimógenos han sido observados en larvas de cabrilla arenera (*P.*

*maculotufasciatus*) a partir del dpe 2 (Peña *et al.*, 2003), mientras que para larvas de corvina blanca (*A. nobilis*), la presencia de los zimógenos se ha observado a partir del dpe 3, por lo que los autores mencionan que la corvina blanca tiene la capacidad de digerir alimento al momento de la abertura de la boca (Galaviz *et al.*, 2011).

Esta misma capacidad ha sido estudiada a través de técnicas moleculares en larvas del lenguado japonés *P. olivaceus* donde se detectó la expresión de precursores de enzimas pancreáticas y se estimó la digestibilidad de proteínas a través de técnicas electroforéticas. Los resultados mostraron que las larvas expresan todas las enzimas pancreáticas desde el momento de la eclosión, y por lo tanto, tienen una alta capacidad de digerir proteínas, lo cual se comprobó al observarse una rápida degradación de los sustratos proteínicos probados (Srivastava *et al.*, 2002). Resultados similares fueron observados en el presente estudio con larvas de totoaba, donde se observó, mediante análisis de expresión de genes de tripsina y quimotripsina, que las larvas expresan ambos genes desde el momento de la eclosión y el nivel de expresión va en aumento conforme el desarrollo de la larva y tipo de alimentación. Para las larvas de totoaba, se detectó un aumento importante en expresión y actividad de tripsina y quimotripsina al realizar el cambio del alimento en el dpe 16 (nauplios de Artemia), lo cual corresponde a lo mencionado por Moyano *et al.* (1996) para larvas de dorada. Este autor menciona que al momento de realizar el cambio de alimento (vivo-microdieta) los niveles de actividad enzimática sufren cambios significativos que

se consideran como una respuesta abrupta a la diferencia nutricional entre el primer y segundo alimento. Al realizar el tercer cambio de alimento (microdieta) se observó una caída de la expresión y actividad de ambas proteasas, respuesta que se relaciona con la composición química de la microdieta, las cuales muy diferente a los alimentos vivos (Cahu y Zambonino-Infante, 2001), pudiendo ser un proceso de adaptación al observarse un incremento en la actividad los días posteriores, aunque con menor intensidad, esta disminución en la actividad de proteasas puede corresponder al momento preciso en que inicia la funcionalidad del estómago (Govoni *et al.*, 1986). Además, se sabe que una vez que el estómago se vuelve funcional, se forman la totalidad de los ciegos pilóricos y se completa la longitud y enrollamiento del intestino, este último incrementa su función hacia la absorción de nutrientes, mientras que el estómago realiza la mayor parte de la digestión (Govoni *et al.*, 1986).

En larvas de totoaba, la formación del estómago fue observado en el dpe 24, sin embargo, las glándulas gástricas fueron detectadas hasta el dpe 28, lo cual difiere a lo encontrado con otras especies de Scianidos como *S. ocellatus* (20-22 dpe, Lazo 1999) y *A. nobilis* (dpe 16, Galaviz *et al.* 2011). De acuerdo con Tanaka (1973), el desarrollo completo de glándulas gástricas, (productores de HCL y pepsinógeno) en el estómago y la formación de ciegos pilóricos, señalan la transformación de la etapa de larva a juvenil, y en la mayoría de las especies es considerado como el momento indicado para realizar el cambio de alimento vivo a dieta formulada o destete (Segner *et al.* 1993). Sin embargo, se ha demostrado

que utilizando dietas formuladas adecuadas para etapas tempranas de larvas, el cambio de alimento vivo a dieta puede ser posible, gracias los requerimientos nutricionales y digestibilidad de las dietas. Esto ha sido demostrado en larvas de la corvina dorada (*Sciaenops ocellatus*), esta especie se ha logrado destetar completamente con una dieta formulada a partir del dpe 8 y las larvas de lobina europea (*Dicentrarchus labrax*) a partir del dpe 10, días antes de que se detectaran las primeras glándulas gástricas (Holt 1993, Cahu *et al.* 1999).

La expresión del pepsinógeno fue detectada por primera vez entre los dpe 14 y 15, mientras que la actividad enzimática fue detectada entre los dpe 18 y 20, ambos eventos ocurrieron en etapas muy tempranas del desarrollo larval, aun cuando no se habían desarrollado las glándulas gástricas en las larvas de totoaba. Patrones similares al pepsinógeno fueron observados en larvas del *P. americanus* por Douglas *et al.* (2004), ellos mencionan que a secreción del pepsinogeno se debió a células gástricas en desarrollo. Así mismo, resultados similares al presente estudio fueron observados por Juarez-Casillas, donde encontró expresión de pepsinogeno en larvas de *P. californicus* cuando aun el estómago y glándulas gástricas no estaban presentes en esta especie. Es muy probable que estas diferencias, puedan deberse a que la cuantificación de expresión y actividad de pepsina, fueron realizados en homogenizados de larvas enteras y los niveles detectados puedan deberse a otro tipo de proteasas acidas como catepsinas (Moyano *et al.* 2006).

# **CAPITULO 3**

## **Corvina blanca**

### **3.0. Corvina blanca (*A. nobilis*)**

La corvina blanca es importante en las capturas comerciales de California y Baja California y es popular en la pesca deportiva del sur de California. En esta zona se ha reportado una reducción sustancial en el tamaño de las poblaciones naturales a causa de la sobreexplotación, por lo que desde 1931 existen regulaciones para su extracción (Vojkovich y Reed 1993). Actualmente existen algunos estudios donde han evaluado los requerimientos nutricionales en juveniles de esta especie. Sin embargo existe muy poca información sobre estudios sobre fisiología digestiva en larvas. El objetivo del presente capítulo fue describir el desarrollo del sistema digestivo y medir la actividad de algunas enzimas digestiva en larvas alimentadas con alimento vivo y microdieta desde el momento de la eclosión hasta el dpe 40, esto con el fin de desarrollar protocolos de alimentación óptimos para cada etapa de desarrollo larval.

#### **3.1. Protocolo de cultivo larvario de corvina blanca (*A. nobilis*)**

##### **3.1.1. Cultivo larvario**

Huevos fertilizados de corvina blanca fueron obtenidos del criadero de peces marinos Hubbs-SeaWorld Research Institute en Carlsbad, California, USA. Los huevos fueron producidos por reproductores capturados del medio silvestre y mantenidos en cautiverio en cuatro grupos separados de 50 peces en proporción de sexo de 1:1. Los reproductores fueron inducidos al desove utilizando el control

del fotoperiodo y la temperatura para simular los ciclos naturales de período de desove que están desfasados entre los cuatro grupos de reproductores mantenidos en laboratorio con el fin de proporcionar huevos todo el año, simulando las condiciones medioambientales de cada estación. Reproductores con un peso estimado de 15-25 kg, fueron alimentados con pescado fresco y calamar cinco días por semana, con una suplementación de vitaminas tres veces a la semana. Los huevos fueron transportados a la Unidad de Biotecnología en Piscicultura de la Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California y tratados con formalina a 100 ppm por una hora con agua de mar filtrada y con aeración constante. Posteriormente fueron sembrados a una densidad de 100 huevos por litro en tanques cónicos de fibra de vidrio con capacidad de 1600 litros de agua de mar estéril pasada por rayos UV y fraccionador de espuma, a una temperatura de 18 °C, con una tasa de circulación de 1.5–2 L<sup>-1</sup> por minuto. Los huevos eclosionaron aproximadamente 48 horas después de la fertilización. Larvas con saco vitelino fueron sembradas a una densidad de 30 individuos por litro en nueve tanques de fibra de vidrio con capacidad de 100-L de agua de mar previamente filtrada y esterilizada.

### **3.1.2. Alimentación**

A partir del dpe 4, las larvas fueron alimentadas tres veces al día a las 08:00, 12:00, y 17:00 h, con nauplios de *Artemia* (Salt Creek Inc., Salt Lake City, UT, USA) enriquecidos con una emulsión de lípidos (Bio-Marine Algamac 3050™) a una concentración de 0.6 g L<sup>-1</sup>. Los nauplios de *Artemia* fueron suministrados al

tanque de cultivo a una concentración de cinco nauplios por mililitro a partir del dpe 4 hasta el dpe 15. La cantidad de alimento vivo disminuyó a partir del dpe 16 cuando se inició una combinación de nauplios de *Artemia* y microdieta (Otohime Japanese Marine Weaning, Reed Mariculture; proteína 52.11%, lípidos 16.3% y cenizas 11.2 %, tamaño de partículas desde 200 hasta 1410  $\mu\text{m}$ ). El período de destete fue completado el dpe 24, cuando el alimento vivo no fue suministrado a las larvas en los tanques de cultivo únicamente la microdieta (Figura 16).

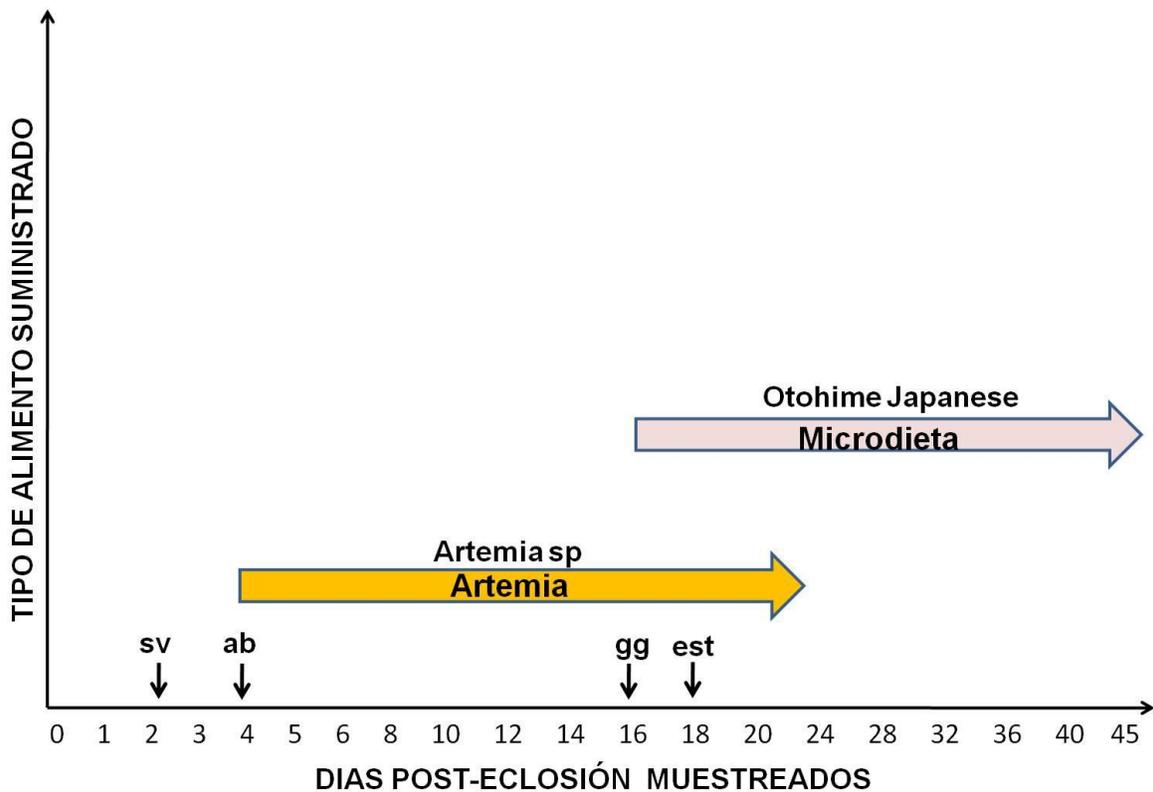


Figura 16. Protocolo de alimentación y toma de muestras durante el larvicultivo de corvina blanca (*A. nobilis*). Se indican los principales eventos que tuvieron lugar durante el desarrollo: ab: apertura de la boca; sv, absorción del saco vitelino; gg, aparición de glándulas gástricas; est, diferenciación del estómago funcional.

### **3.1.3. Colecta de muestras de larvas para análisis histológicos y bioquímicos**

Dependiendo de su talla, larvas de corvina blanca (n = 20 -150) fueron muestreadas aleatoriamente directamente de los tanques de cultivo experimental, usando una malla de 200µm. Las muestras fueron colectadas una hora después de la primera alimentación (8.00 a.m) esto con el fin de descartar posibles efectos de enzimas provenientes del alimento vivo. Las muestras de larvas fueron colectadas diariamente desde el dpe 0 hasta el dpe 6, luego las muestras fueron colectadas cada dos días hasta el dpe 20 y cada cuatro días hasta el final del estudio (dpe 40). Las larvas fueron anestesiadas con tricaina metálsulfonato-MS 222, luego fueron lavadas con agua destilada con el fin de remover todo el exceso de sales y por ultimo fueron almacenadas a -70 °C hasta su análisis (Figura 7, en sección 2.2.1.).

### **3.1.4. Determinación de proteína soluble**

La concentración de proteína soluble de cada muestra se determinó por triplicado de acuerdo a Bradford (1976), utilizando un kit de Bio-Rad como se describe en la sección 2.2.2.

### **3.1.5. Cuantificación de la actividad proteolítica**

La Tabla II (Sección 2.2.2.) indica los sustratos utilizados para cuantificar por espectrofotometría la actividad de algunas enzimas proteolíticas presentes en los extractos larvarios. A continuación se describe brevemente la metodología empleada.

**Actividad proteolítica ácida total (pepsina):** Para la medición de la actividad proteolítica ácida se utilizó una modificación de la metodología de Sarath *et al.* (1989). El desarrollo de la técnica se muestra en la sección 2.2.3.

**Actividad tipo tripsina:** Para la medición de la actividad tipo tripsina se utilizó una modificación de la metodología de Erlanger *et al.* (1961). El desarrollo de la técnica se muestra en la sección 2.2.3.

**Actividad tipo quimotripsina:** Para la medición de la actividad tipo quimotripsina se utilizó la metodología de Hummel (1959) con las modificaciones realizadas por Applebaum *et al.* (2001). El desarrollo de la técnica se muestra en la sección 2.2.3.

**Actividad tipo leucina-aminopeptidasa.** Para la medición de la actividad de leucina-aminopeptidasa se utilizó la metodología reportada por Appel (1974). Esta enzima se encuentra asociada al epitelio intestinal, por lo que se utilizó el extracto no centrifugado al cuantificar su actividad, ya que al centrifugar y eliminar los tejidos no disueltos en el agua puede perderse cierta cantidad de la enzima. La cantidad de extracto enzimático no centrifugado necesario para detectar la actividad (20-50  $\mu$ l) se llevó a un volumen final de 50  $\mu$ l con agua destilada. La reacción se inició al añadir 450  $\mu$ l de leucina- p-nitroanilida y se incubó por 30 min a 37 °C. Se leyó la absorbancia antes y después del período de incubación y se registró el cambio ocurrido. El blanco fue agua desionizada incubada con el sustrato. La reacción fue detenida añadiendo ácido acético al 30%. Una unidad de

actividad enzimática fue definida como 1  $\mu\text{g}$  nitroanilide liberada por minuto, utilizando el coeficiente de extinción molar de 8.2.

**Actividad tipo  $\alpha$ -amilasa.** El análisis para la  $\alpha$ -amilasa fue de acuerdo a lo reportado por Vega-Villasante et al. (1993), utilizando almidón soluble (1%) como sustrato. Se colocaron en una celda 50  $\mu\text{l}$  de extracto enzimático dejándolo estabilizar durante 3 minutos a 25 °C. Inmediatamente se le añadió 50  $\mu\text{l}$  de almidón al 1% y se dejó reposar durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se detuvo la reacción adicionando 1 ml de ácido dinitrosalicílico al 20% e incubado por 5 min en baño María a punto de ebullición (90-100°C). La celda se dejó enfriar a temperatura ambiente y después se añadió 10 ml de agua destilada. Se registró la absorbancia a 540 nm mediante una lectura de un espectrofotómetro contra un blanco donde el extracto enzimático se inactivó con adición del ácido tricloroacético al inicio de la reacción. Una unidad corresponde a la cantidad de enzima requerida para aumentar en 0.01 unidades de la absorbancia a 540 nm por minuto.

### **3.1.6. Cálculo de actividades específicas.**

La actividad de un extracto problema se determinó utilizando las siguientes ecuaciones mostradas en la sección 2.2.4.

### **3.2. Análisis histológico**

Para el estudio del desarrollo del sistema digestivo se usaron tamaños de muestras diferentes dependiendo del día post eclosión de las larvas (por tanto de su talla y peso). Las larvas fueron fijadas por 24 horas en solución de paraformaldehído 2% (preparada en solución amortiguadora de fosfatos, PBS), lavadas con agua destilada y posteriormente almacenadas en etanol 70% a 4 °C hasta su procesamiento.

Las muestras se deshidrataron en soluciones sucesivas de etanol, benceno y finalmente se incluyeron en parafina en un deshidratador de tejidos automático Leica TP 1040 en el laboratorio de histología de la Facultad de Ciencias en la Universidad Autónoma de Baja California, Campus Ensenada. Los bloques de parafina se cortaron sagitalmente en un micrótopo convencional (Leica-RM 2125 RT) en láminas de 4 y 5  $\mu\text{m}$  de espesor, que se desparafinaron, rehidrataron en soluciones sucesivas de xileno, etanol y agua destilada y se tiñeron con hematoxilina-eosina (Humanson 1979). Las láminas se fotografiaron en una cámara digital PAXcam2 (Pax-it versión 6, Mis Inc., USA) software conectada a un microscopio BH-2 Olympus (Japón) (Figura 8, sección 2.2.4.), para posteriormente realizar la descripción del desarrollo del sistema digestivo de las larvas.

### **3.3. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección 2.2.5.

### **3.4. Resultados corvina blanca.**

#### **3.4.1. Crecimiento larvario**

El peso húmedo (mg) y longitud total (mm) promedio de las larvas de corvina blanca se calculó durante el desarrollo del experimento como se muestra en la Figura 17. Desde el día-post-eclosión (dpe) 0 hasta el 14, el crecimiento en peso fue muy lento, sin embargo, a partir del dpe 16 se observó un incremento en forma exponencial hasta el final del experimento. En cuanto a la longitud, se observó un crecimiento muy similar durante los primeros seis días, incrementándose en forma exponencial a partir del dpe 8, manteniéndose así hasta el final del experimento.

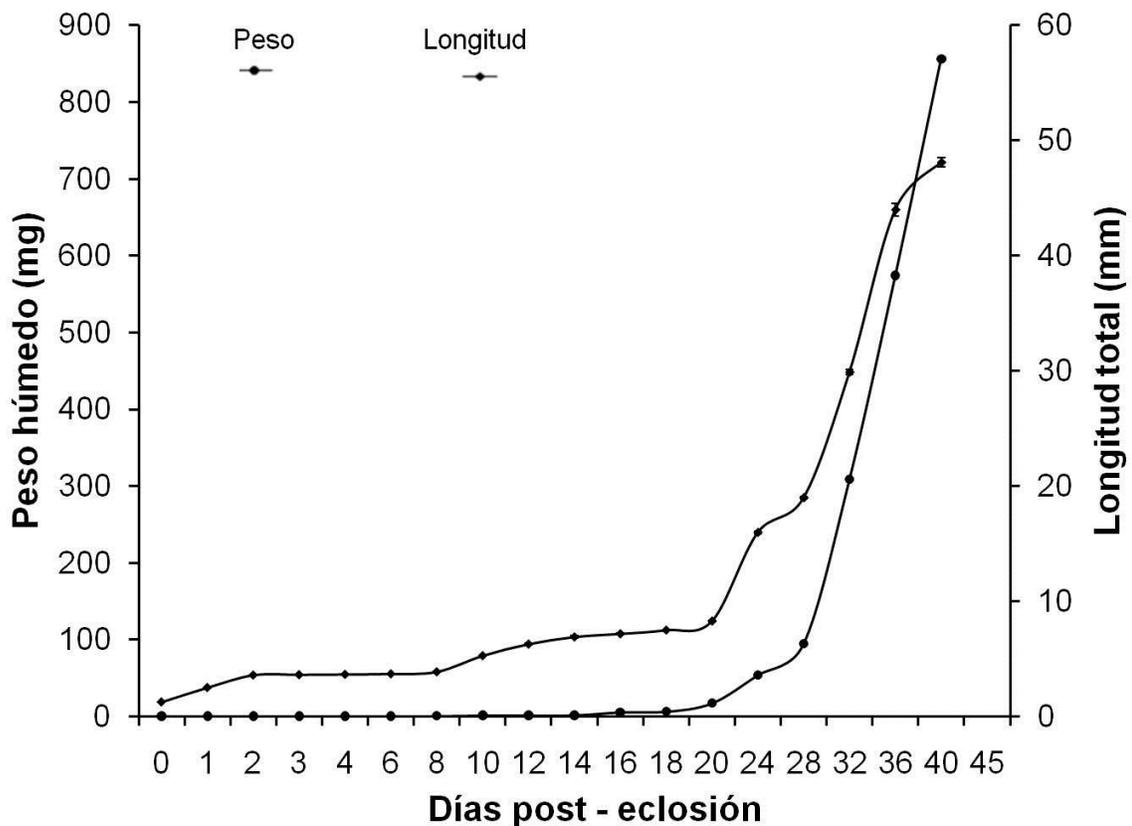


Figura 17. Longitud y peso del grupo de larvas de corvina blanca (cm, mg larva  $\pm$  DE. n=3).

### 3.4.2. Desarrollo del sistema digestivo.

Al momento de la eclosión ( $0.51 \pm 0.003$  mg,  $1.3 \pm 0.001$  mm), el sistema digestivo de corvina blanca fue indiferenciado y se presentó como un simple tubo recto cerrado en exterior (bucofaringe y ano aun no estaban diferenciados) descansando sobre el saco vitelino (Figura 18A). Durante la absorción del saco vitelino (1-2 dpe), el sistema digestivo se diferenció en bucofaringe, esófago e intestino. En el dpe 3 la boca estaba abierta, la vejiga natatoria fue diferenciada, el hígado continuó desarrollándose y el intestino posterior y algunos tejidos conectivos fueron visibles (Figura 18B).

Análisis histológicos revelaron que el ducto urinario, la vejiga natatoria, intestino, hígado y páncreas fueron observados el dpe 3, y en el dpe 8 células basófilas del páncreas exocrino difuso fueron visibles y el intestino estaba bordeado por las células epiteliales ciliadas columnares con núcleos basales definidos (Figura 18C).

En el dpe 12 el esófago estaba bien desarrollado y el estómago fue visible como una extensión del esófago. El hígado continuó desarrollándose e incrementándose en tamaño y se observó el ducto biliar entre el hígado y las células exocrinas del páncreas. El conducto urinario relacionado con el ano también fue observado, así como el riñón embrionario (pronefros) y el corazón (Figura 18D).

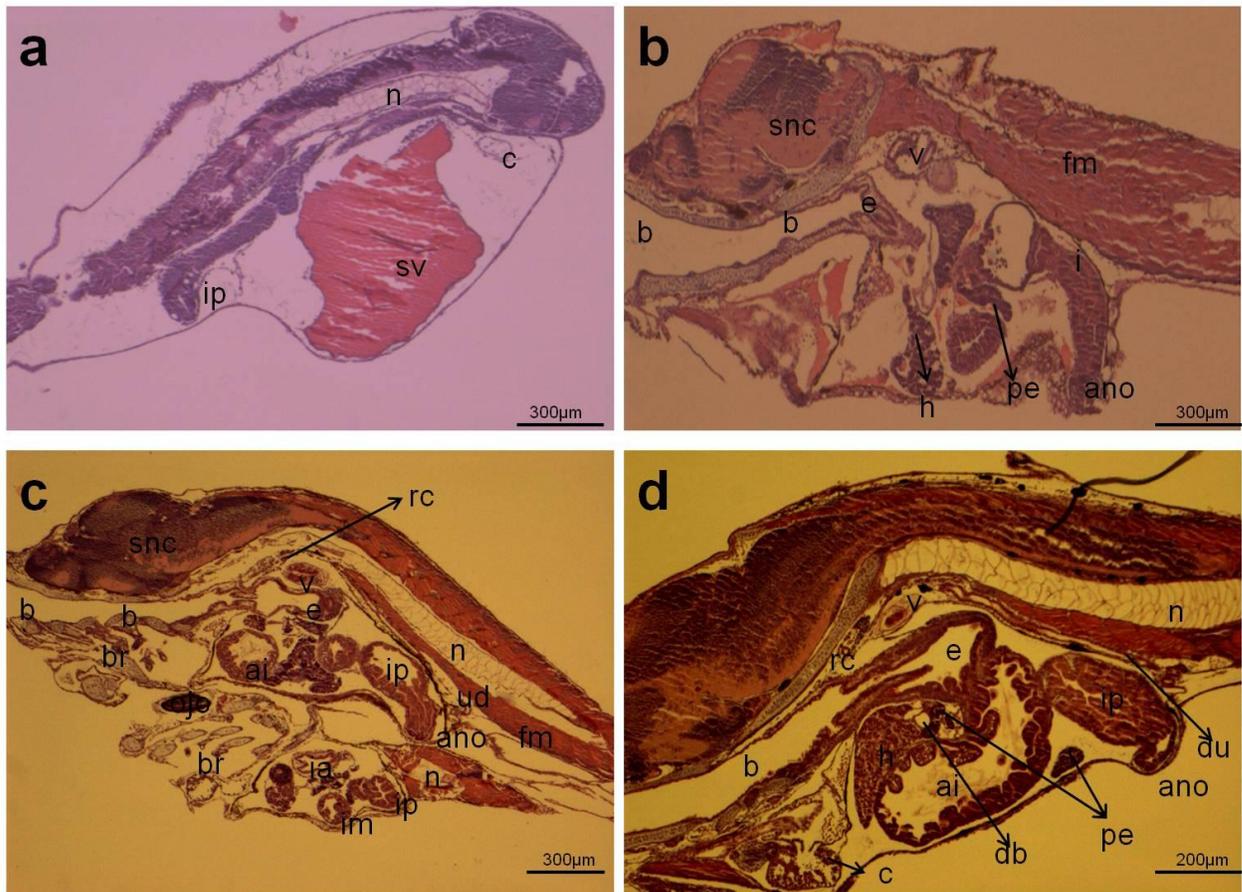


Figura 18. Secciones sagitales de larvas de corvina blanca. (A) dpe 1, (B) dpe 3, (C) dpe 8 y (D) dpe 12. (b) boca, (br) branquias, (bc) bucofaringe, (c) corazón, (db) ducto biliar, (du) ducto urinario (e) esófago, (ga) gota de aceite, (h) hígado, (la) intestino anterior, (im) intestino medio, (ip) intestino posterior, (n) notocordio, (pe) páncreas exocrino, (rc) riñón cefálico (sv) saco vitelino, (V) vejiga.

Las glándulas gástricas fueron identificadas en el dpe 16 en pequeños grupos de células cubicas con un núcleo central prominente y la formación de pequeños acinos glandulares en la mucosa (Figura 19A). El tamaño y el número de las glándulas gástricas estuvieron relacionados con el desarrollo y edad de la larva. Células de la mucosa del esófago aparecieron e incrementaron en número y

el hígado incrementó significativamente con el tamaño en el dpe 16. Todos los órganos del sistema digestivo fueron visibles en la sección histológica y fueron completamente desarrollados entre el dpe 18 y 32. Durante esta fase, los cambios más visibles en la morfología del tracto digestivo fueron la formación del estómago, aparición de pequeñas inclusiones vacuolares en los enterocitos del intestino medio, agrandamiento del hígado, y el páncreas exocrino embebido en el intestino medio y del tejido adyacente (Figura 19B). Así mismo, en el dpe 20 se observó un rápido incremento en el número de glándulas gástricas y en el tamaño del estómago (Figura 19C).

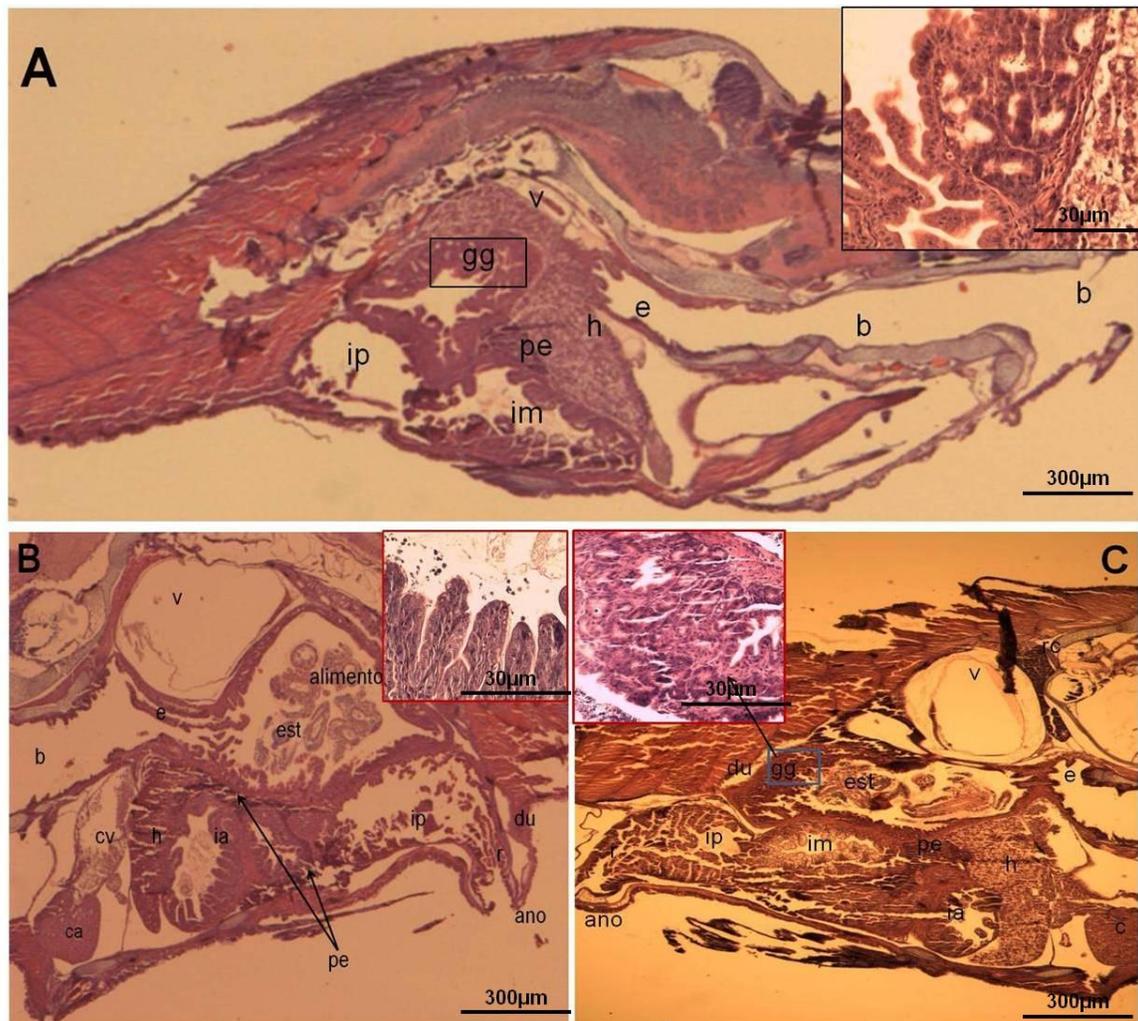


Figura 19. Secciones sagitales del sistema digestivo de larvas de corvina blanca. (A) dpe 16, (B) dpe 18, (C) dpe 20. (b) boca, (br) branquias, (bc) bucofaringe, (c) corazón, (db) ducto biliar, (du) ducto urinario (e) esófago, (est) estómago, (gg) glándulas gástricas, (h) hígado, (la) intestino anterior, (im) intestino medio, (ip) intestino posterior, (n) notocordio, (ojo) ojo, (pe) páncreas exocrino, (rc) riñón cefálico, (V) vejiga.

Para el dpe 24 el intestino fue observado en forma de lazo (loop) (Figura 20 A). El sistema digestivo tomó la forma del de un ejemplar adulto en el dpe 32, con el estómago completamente desarrollado que contenía un gran número de glándulas gástricas (Figura 20B). El estómago se observó conectado al intestino

anterior a través del esfínter pilórico, que estaba cubierto por una gruesa pared muscular, esta diferenciación se pudo observar en cortes de larvas en el dpe 40 (Figura 20C).

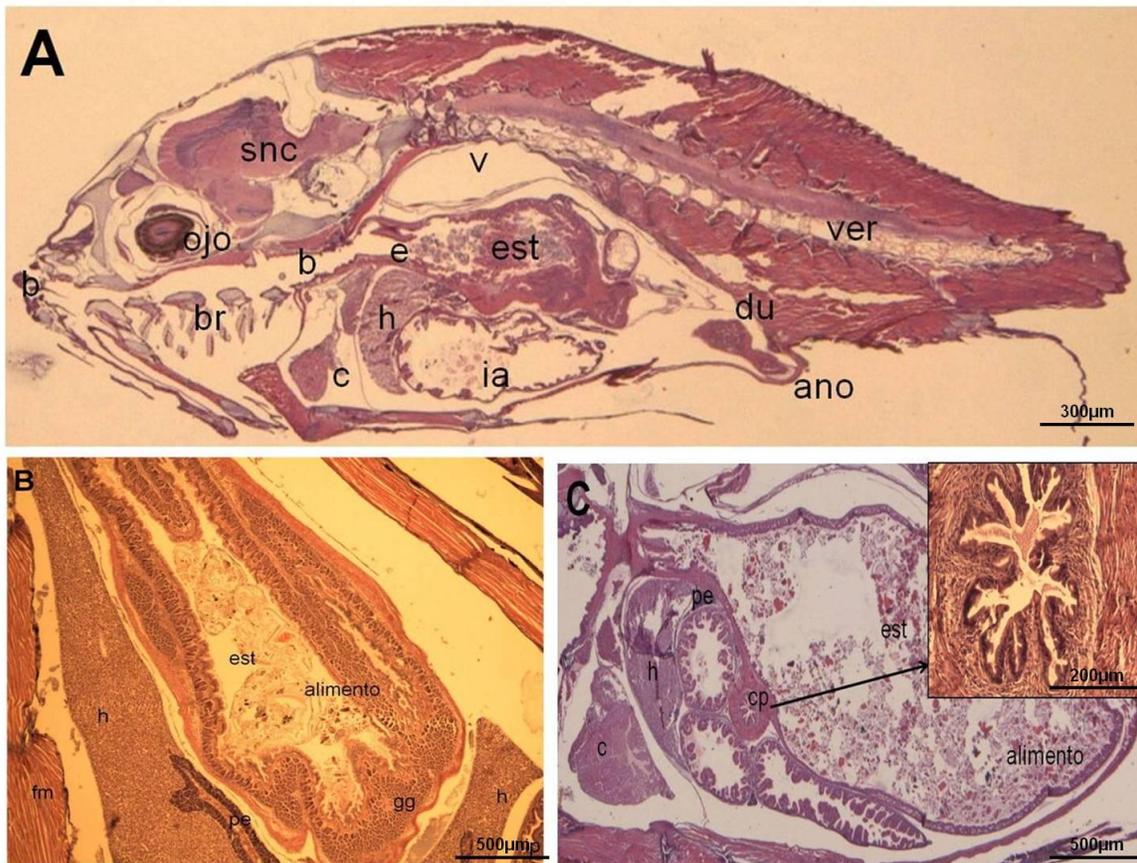


Figura 20. Secciones sagitales del sistema digestivo de larvas de corvina blanca. (A) dpe 24, (B) dpe 32, (C) dpe 40. (b) boca, (br) branquias, (bc) bucofaringe, (c) corazón, (cp) ciegos pilóricos, (du) ducto urinario, (e) esófago, (est) estomago, (gg) glándulas gástricas, (h) hígado, (ia) intestino anterior, (im) intestino medio, (ip) intestino posterior, (n) notocordio, (ojo) ojo, (pe) páncreas exocrino, (rc) riñón cefálico, (V) vejiga, (ver) vertebra.

### **3.4.3. Actividad enzimática.**

#### **3.4.3.1. Tripsina**

La actividad específica de tripsina fue detectada temprano desde el dpe 1 con una concentración de  $0.80 \pm 0.16$  mU/mg proteína ( $0.51 \pm 0.001$  mg peso húmedo,  $2.5 \pm 0.02$  mm longitud total), e incrementó gradualmente durante los siguientes días, pero más notable después del inicio de la primera alimentación exógena, entre los días 5 y 6 dpe hasta el dpe 14 ( $5.84 \pm 0.20$  mU/mg proteína). Después de este día, la actividad de tripsina disminuyó hasta el dpe 18, incrementando de nuevo en el dpe 24 y observándose de nuevo un incremento en el nivel de actividad específica en el dpe 32. Después de este día, cuando el nivel de actividad fue de  $9.75 \pm 0.36$  mU/mg proteína, la actividad de tripsina disminuyó hasta el final del experimento en el dpe 40 (Figura 21A). Así mismo, en la cuantificación de actividad total en mU/larva, se observó un incremento en el nivel de actividad con respecto a la edad de la larva, disminuyendo de manera similar la cuantificación de actividad específica en  $\text{mU mg}^{-1}$  proteína (Figura 21B).

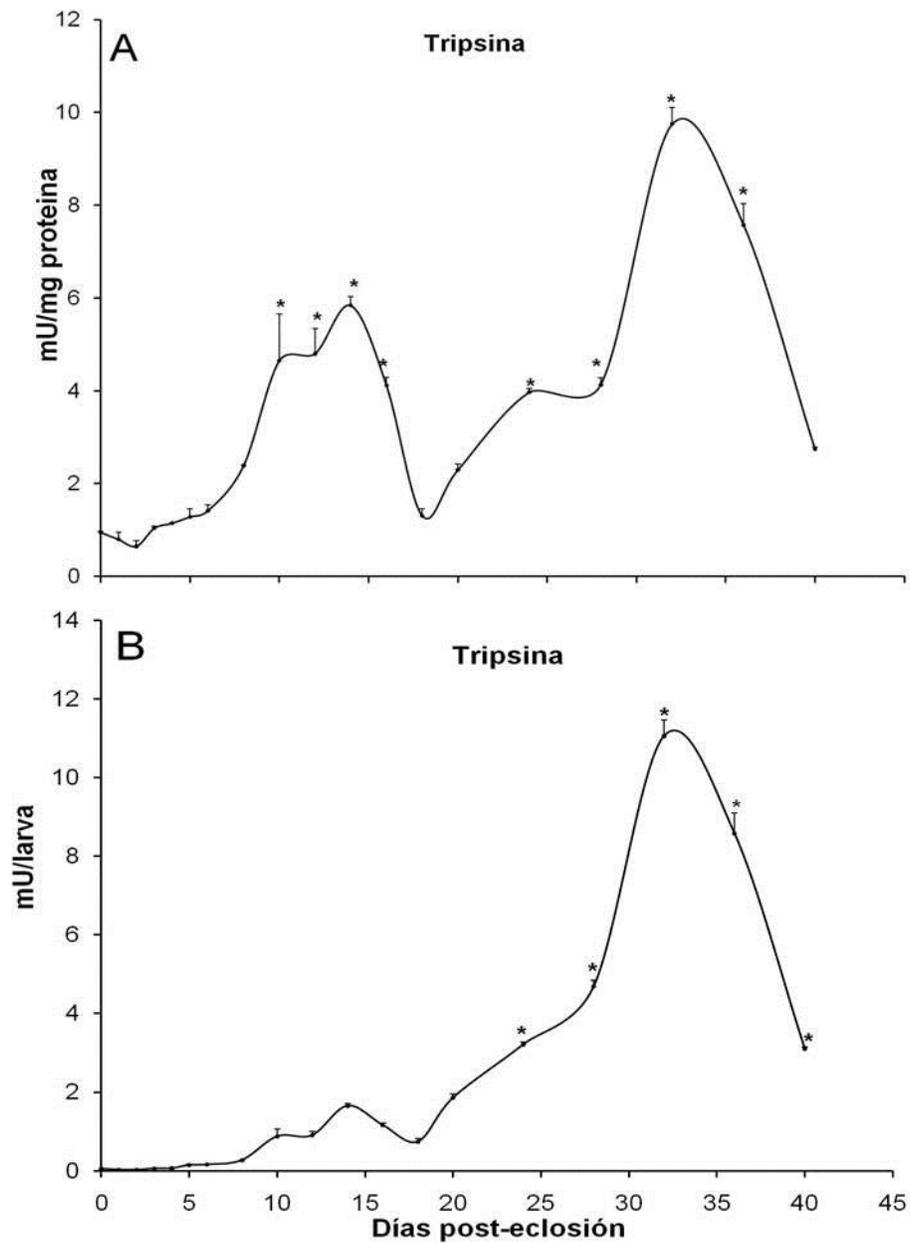


Figura 21. Actividad específica y total de tripsina en larvas de corvina blanca durante su desarrollo larvario (Media  $\pm$ D.E n=3). (\*) Indican diferencias significativas en el tiempo.

### **3.4.3.2. Quimotripsina**

La actividad específica de quimotripsina fue detectada al igual que tripsina desde el dpe 1 ( $7.21 \pm 1.29 \text{ mU} \times 10^{-4} / \text{mg}$  proteína). El máximo nivel de actividad de quimotripsina ( $15.92 \pm 1.02 \text{ mU} \times 10^{-4} / \text{mg}$  proteína) fue observada dos días después del cambio de alimento vivo a alimento inerte (destete) el dpe 18. Después de este día, la actividad específica de quimotripsina disminuyó y se mantuvo constante hasta el final del estudio el dpe 40 (Figura 22A). La actividad total en  $\text{mU} \times 10^{-4} / \text{larva}$ , se presentó de manera similar a la actividad específica excepto al inicio del período larval, ya que niveles muy bajos de actividad total fueron observados en el dpe 1 (Figura 22B).

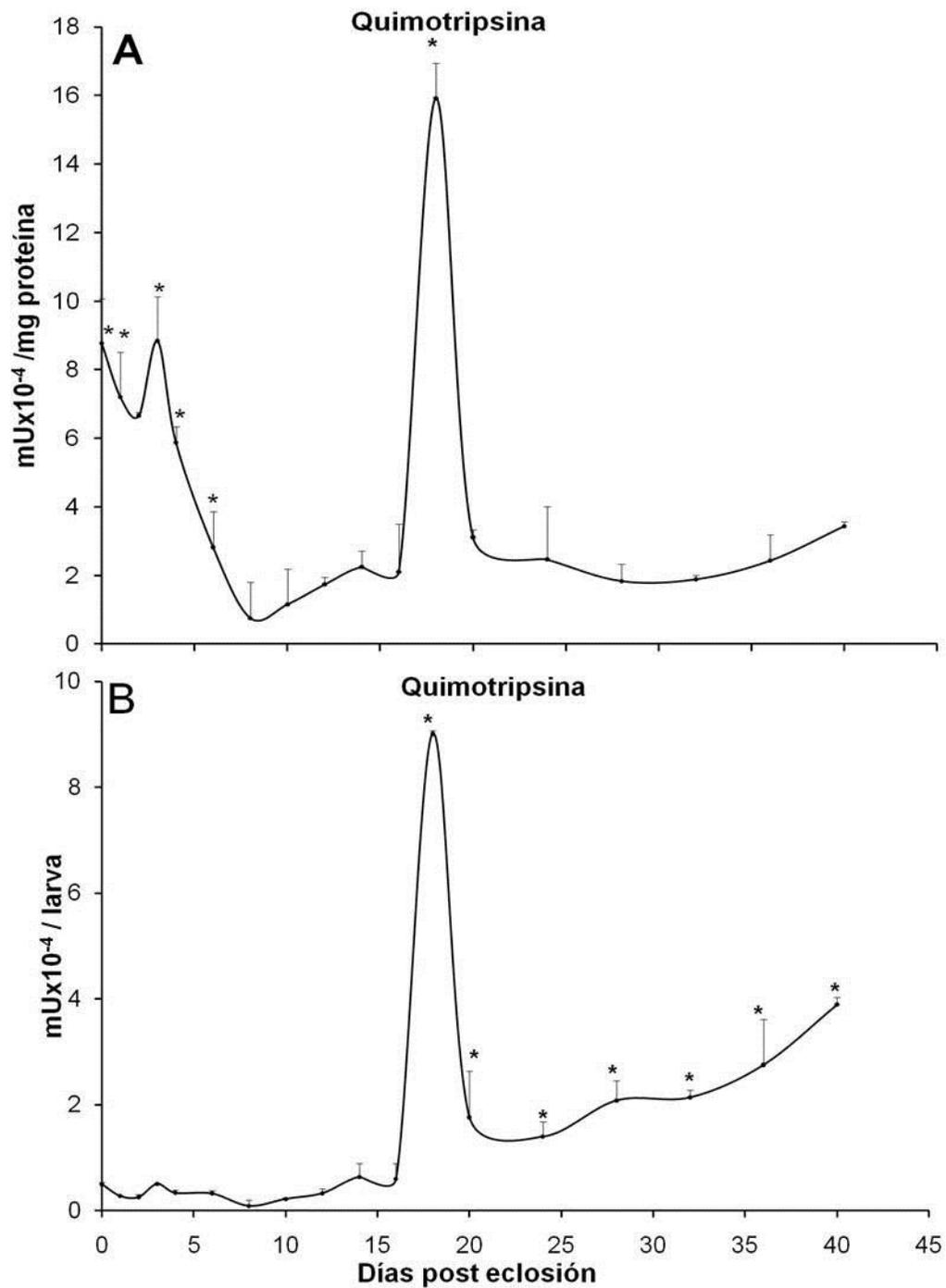


Figura 22. Actividad específica y total de quimotripsina en larvas de corvina blanca durante su desarrollo larvario (Media  $\pm$ DE n=3). (\*) indican diferencias significativas en el tiempo.

### **3.4.3.3. Leucina-Aminopeptidasa**

La actividad específica de Leucina-Aminopeptidasa fue detectada en el dpe 1 ( $1.31 \pm 0.05 \text{ mU} \times 10^{-3} / \text{mg}$  proteína), y siguió aumentando hasta el dpe 18 ( $15.91 \pm 0.40 \text{ mU} \times 10^{-3} / \text{mg}$  proteína). Este incremento fue seguido por una disminución hacia el dpe 20. La actividad incrementó de nuevo del dpe 28 en adelante (Figura 23A). Así mismo en la cuantificación de actividad total en  $\text{mU} \times 10^{-3} / \text{larva}$ , se observó un incremento en el nivel de actividad de leucina-aminopeptidasa con respecto a la edad de la larva, observándose un patrón muy similar con respecto al nivel de actividad específica (Figura 23B).

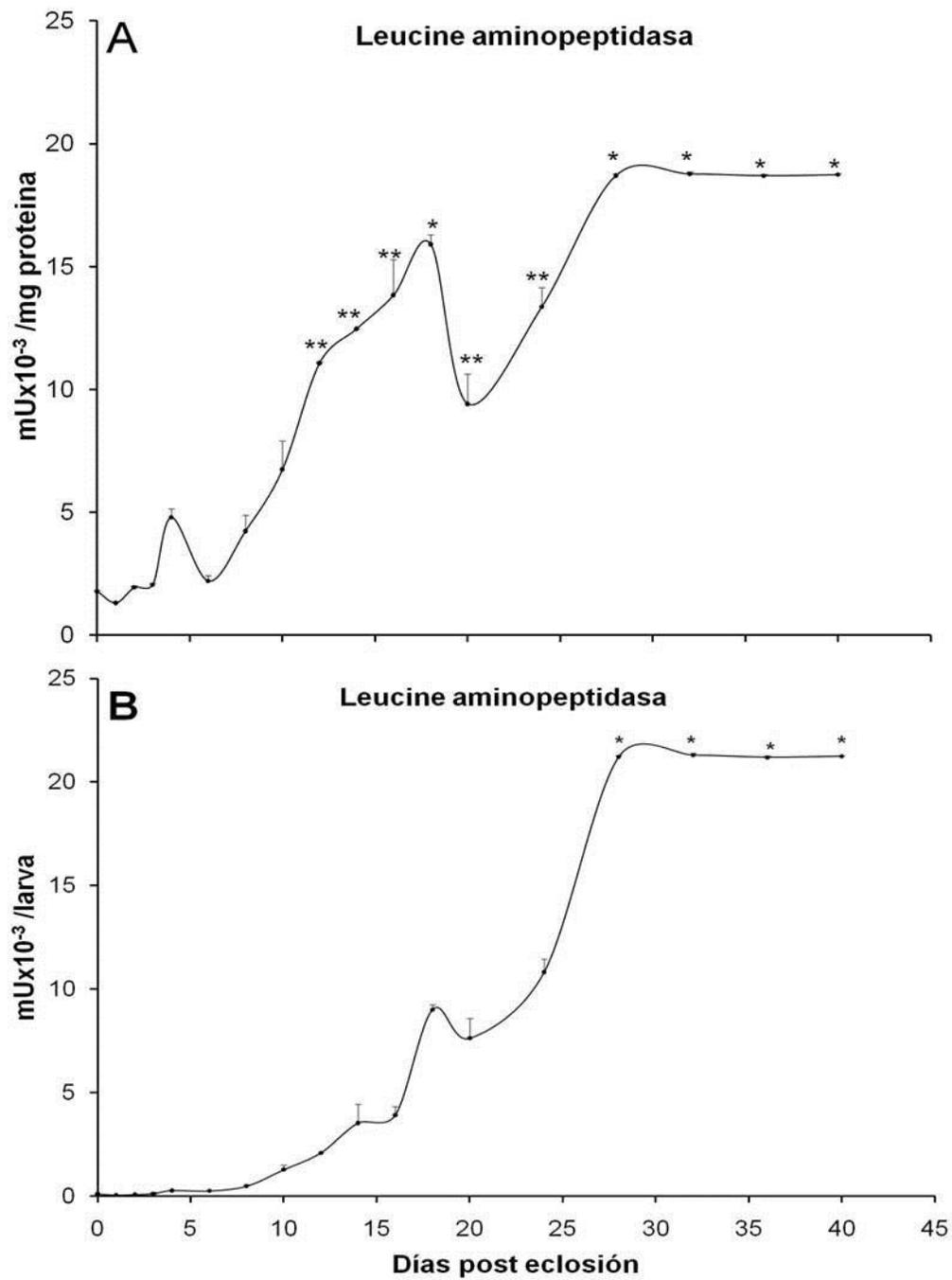


Figura 23. Actividad específica y total de leucine-aminopeptidasa en larvas de corvina blanca durante su desarrollo larvario (Media  $\pm$ DE n=3). (\*) indican diferencias significativas en el tiempo.

#### **3.4.3.4. Pepsina**

La actividad específica de proteasa acida (pepsina) fue detectada en el dpe 10 ( $0.71 \pm 0.53$  U/mg proteína), y se observó un aumento continuo de su actividad hasta el final del experimento. El primer incremento significativo fue observado en el dpe 20 ( $3.61 \pm 1.3$  U/mg proteína), cuatro días después de la presencia de las primeras glándulas gástricas; el nivel de actividad de pepsina disminuyó en el dpe 24, incrementando de nuevo y alcanzando su nivel máximo en el dpe 40 ( $13.92 \pm 0.1$  U/mg proteína) (Figura 24A). El nivel de actividad total en U/larva observado en pepsina, presentó un patrón muy similar al mostrado en actividad específica, observándose un incremento significativo en el dpe 20 como se muestra en ambas gráficas (Figura 24B).

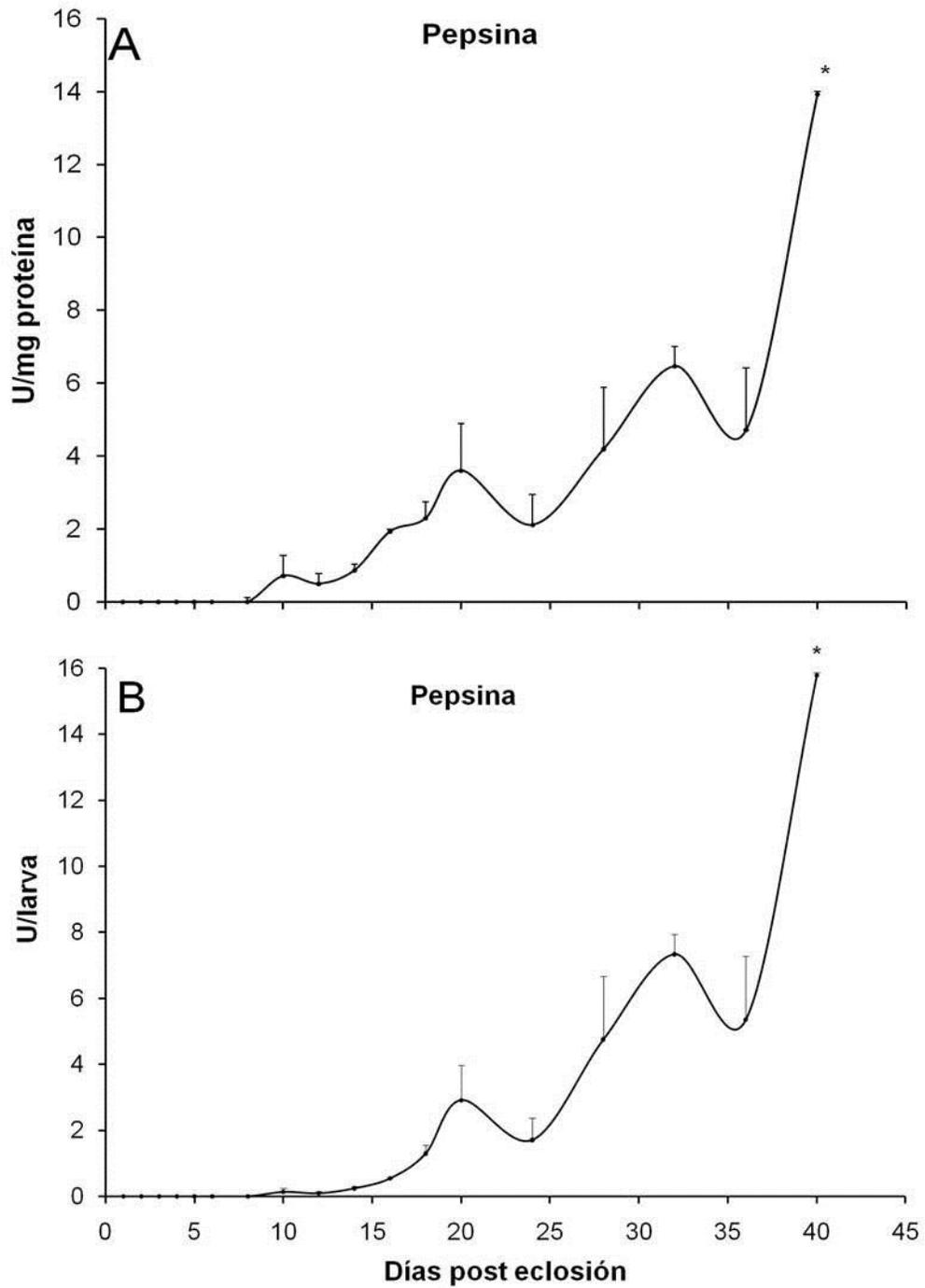


Figura 24. Actividad específica y total de pepsina en larvas de corvina blanca durante su desarrollo larvario (Media  $\pm$ D.E n=3). (\*) indican diferencias significativas en el tiempo.

### **3.4.3.5. $\alpha$ -amilasa**

La actividad de  $\alpha$ -amilasa alcanzó su nivel máximo el dpe 16 ( $8.07 \pm 0.98$  U  $\text{mg}^{-1}$  proteína), coincidiendo con el inicio del cambio de alimento vivo a alimento inerte (destete). El nivel de actividad específica disminuyó el dpe 18, pero volvió a incrementar en el dpe 20 ( $4.44 \pm 0.38$  U/mg proteína), y se mantuvo con fluctuaciones hasta el final del estudio en el (dpe 40) (Figura 25A). Así mismo, en la cuantificación de actividad total en U/larva, se observó un incremento en el nivel de actividad con respecto a la edad de la larva, disminuyendo de manera similar a la actividad específica en U/mg proteína, sin embargo, la actividad por U/larva se detectó a un nivel casi de cero al momento de la eclosión, mientras que en actividad específica fue detectada en el dpe 1 (Figura 25B).

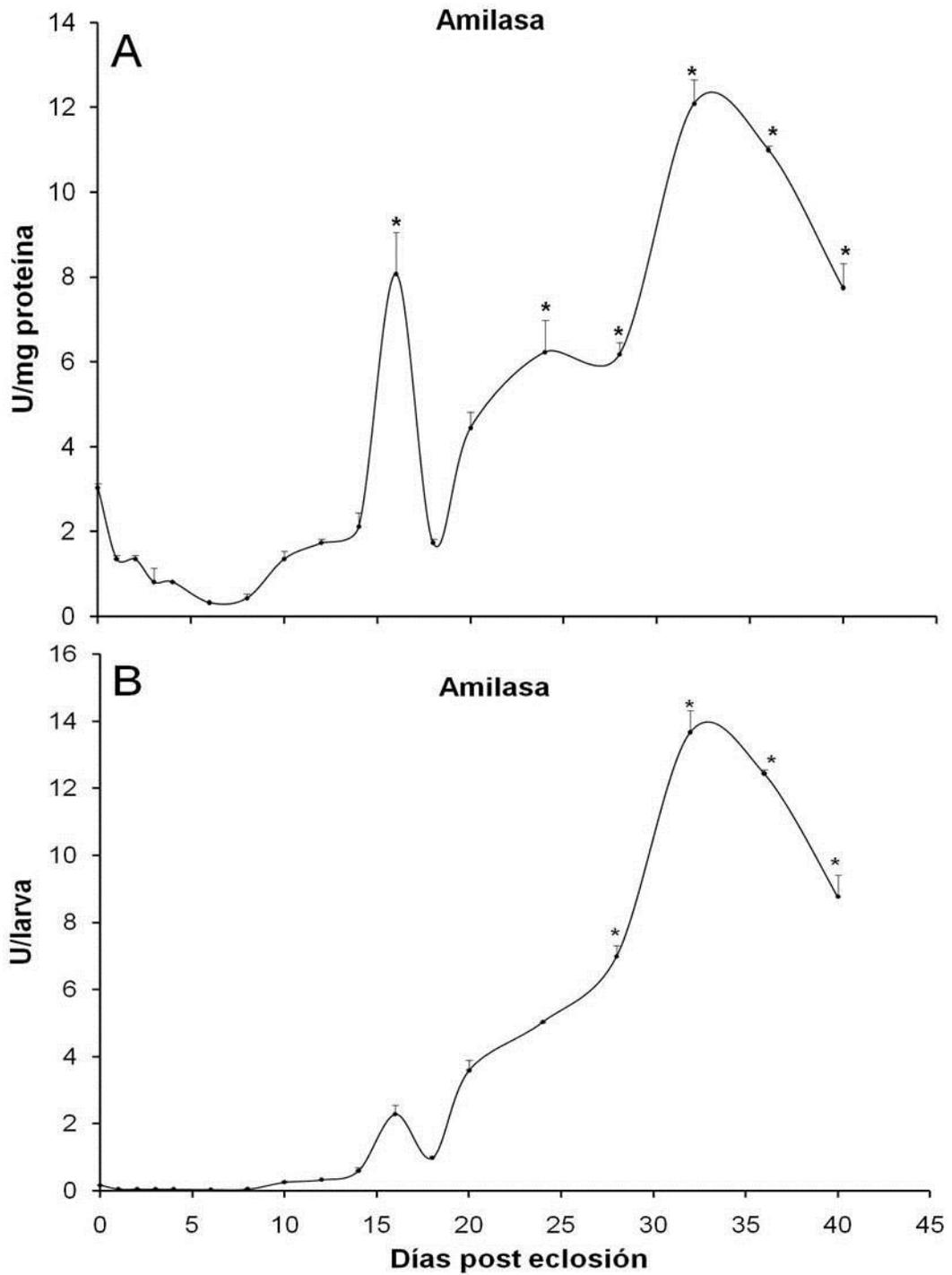


Figura 25. Actividad específica y total de  $\alpha$ -Amilasa en larvas de corvina blanca durante su desarrollo larvario (Media  $\pm$ D.E n=3). (\*) indican diferencias significativas.

### **3.5. Discusión**

Al momento de la eclosión, el tracto digestivo de larvas de corvina blanca se observó como un simple tubo de células indiferenciadas descansando dorsalmente sobre el saco vitelino. En el presente estudio, la actividad de enzimas pancreáticas fue detectada al momento de la eclosión, incrementando gradualmente hasta alcanzar su máximo nivel de actividad después del dpe 10 y 15. En este aspecto, las actividades específicas de enzimas digestivas han sido descritas en varias especies de peces (Zambonino-Infante y Cahu 1994; Lazo *et al.*, 2000; Álvarez-González *et al.*, 2006; García-Gasca *et al.*, 2006; Álvarez-González *et al.*, 2006, 2008 y 2010). El nivel de actividad de estas enzimas fue independiente del alimento, debido a que las larvas no recibieron alimento exógeno hasta el dpe 4. Antes de la absorción del saco vitelino, la tripsina se mostró en su forma inactiva (tripsinógeno) y se volvió activa después de la apertura de la boca y la ingesta de la primera alimentación, posiblemente por efecto de estímulos químicos (Uebershär, 1993, Kurokawa y Suzuki, 1996; Moyano *et al.*, 1996; Lazo *et al.*, 2000, y Álvarez -González *et al.*, 2006). En larvas de corvina blanca, la actividad de tripsina fue detectada por primera vez al momento de la eclosión e incrementó a partir del dpe 3-4. Resultados similares a los nuestros fueron encontrados en larvas de *Solea senegalensis* (Ribeiro *et al.*, 1999), *Seriola lalandi* (Chen *et al.*, 2006), *Sphoeroides annulatus* (García-Gasca *et al.*, 2006) y *Pagrus pagrus* (Suzer *et al.*, 2007). Se ha reportado que al inicio de la alimentación exógena se presenta actividad específica de tripsina en algunas

especies de peces (Zambonino-Infante y Cahu 1994, Alarcón 1997, Lazo *et al.*, 2000), incluso se ha detectado actividad específica de tripsina en condiciones de ayuno (Moyano *et al.*, 1996). Esto sugiere que la actividad específica inicial está programada genéticamente y no está únicamente determinada por la ingesta de alimento vivo. Así mismo, los estudios mediante análisis sobre el desarrollo del sistema digestivo sugieren una funcionalidad temprana de órganos como el hígado y páncreas cuando el saco vitelino de las larvas ha sido absorbido por completo, las larvas podrían tener la capacidad para ingerir, digerir y asimilar la primera alimentación exógena (Sarasquete *et al.*, 1995; Micale *et al.*, 2006, 2008).

La actividad específica de quimotripsina fue detectada a niveles muy bajos en homogenizado de cuerpo entero en larvas de corvina blanca el dpe 1, antes de la primera alimentación exógena. Resultados similares fueron reportados por Baragi y Lovell (1986) y Applebaum *et al.* (2001) con respecto a quimotripsina, así mismo, se observó actividad específica de tripsina en varias especies de peces (Baragi y Lovell 1986; Pedersen 1993; Walford y Lam 1993; Oozeki y Bailey, 1995; Moyano *et al.* 1996; Ribeiro *et al.* 1999; Lazo *et al.* 2000b; Zambonino-Infante y Cahu, 1994). Esto sugiere que la activación de quimotripsina es debida a mecanismos intrínsecos en lugar de ser actividad por estímulos del alimento de acuerdo a lo reportado por Dabrowsky (1984). A esta edad temprana, el tracto digestivo de corvina blanca es indiferenciado con boca y ano aun cerrados por ambos extremos y la actividad observada puede ser producto de las enzimas relacionadas con el metabolismo del material del saco vitelino (Tanaka 1972;

Kawai y Ikeda 1973; Segner *et al.*, 1989). Un incremento significativo del nivel de actividad de quimotripsina fue observado entre el inicio de la primera alimentación y el final del período de estudio (40 dpe). Los patrones de actividad específica durante el desarrollo ontogénico de corvina blanca fueron similares a lo observado en *Morone saxatilis* (Baragi y Lovell, 1986) y *Sciaenops ocellatus* (Applebaum *et al.*, 2001).

En el presente estudio, extracto enzimático de cuerpo entero fue utilizado para determinar la actividad enzimática específica de quimotripsina durante los primeros días, con lo cual se infiere que los valores de actividad pueden variar dependiendo de la especificidad del sustrato. Sin embargo, un alto nivel de actividad específica puede observarse cuando el tracto digestivo es disecado y analizado por separado. En el presente estudio con larvas de corvina blanca se observó un incremento significativo el dpe 4 y 16, coincidiendo con el inicio de la primera alimentación, y con el cambio de alimento vivo a alimento inerte (destete) respectivamente, así mismo, coincidió con el inicio de medición del nivel de actividad específica de quimotripsina a partir del tracto digestivo puro. Resultados similares a nuestro estudio han sido reportados en *S. ocellatus* (Lazo *et al.*, 2000 y Applebaum *et al.*, 2001). En el presente estudio los patrones de actividad de tripsina difieren de lo observado en los patrones de actividad de quimotripsina, ya que el nivel de actividad de tripsina continuó incrementándose a partir del dpe 4 cuando inició la alimentación exógena, observándose una disminución bien marcada en el dpe 16, mientras que, el nivel de actividad de quimotripsina

incrementó significativamente en el dpe 16, para luego disminuir en el dpe 18 y mantenerse así hasta el final del estudio (dpe 40). estas diferencias pueden ser debidas a que en este período, y en particular en esta especie carnívora marina, la enzima tripsina es más significativa en la digestión de la proteína de la dieta que la quimotripsina, además se observó que el nivel de actividad de quimotripsina no mostró con la tendencia que generalmente persiste en las etapas en que el sistema digestivo está maduro donde algunos autores indican que existe una mayor actividad de tripsina que de quimotripsina en especies de peces carnívoros (Jonas *et al.*, 1983; Chong *et al.*, 2002).

Las larvas de corvina blanca presentaron un nivel de actividad bajo de tripsina, quimotripsina y leucina-aminopeptidasa al dpe 1. Tripsina y quimotripsina son enzimas pancreáticas, responsables de la digestión luminal de macromoléculas, mientras que la leucina-aminopeptidasa es una enzima del borde en cepillo de los enterocitos, que completa el rompimiento de los péptidos hasta monómeros (Segner *et al.*, 1993). El incremento en la actividad de leucina aminopeptidasa con la edad de las larvas indica un adecuado desarrollo y maduración del intestino, específicamente del borde en cepillo de los enterocitos (Zambonino-Infante *et al.*, 1997). Esta enzima se detectó a un nivel bajo al momento de la eclosión e incrementó su actividad a partir del dpe 4 cuando la larva abrió su boca e inició la primera alimentación exógena. La baja actividad de leucina-aminopeptidasa durante los primeros días de vida, también ha sido detectada en larvas de lobina (dpe 4) y tilapia (dpe 3), donde se ha cuantificado su

actividad por medio de técnicas *in vitro*, observando la presencia de esta enzima y gránulos de zimógeno en el intestino de las larvas, justo antes de la primera alimentación (Zambonino-Infante y Cahu, 1994; Tengjaroenkul *et al.*, 2002). Así mismo, esta actividad fue detectada en el epitelio de la región distal del tracto digestivo de embriones de rodaballo *Scophthalmus maximus*, mientras que en larvas que ya eran alimentadas, la actividad fue observada en la parte media y posterior del intestino utilizando técnicas histoquímicas (Cousin *et al.*, 1987). La presencia de esta enzima ha sido atribuida a una programación genética de su expresión que permitió la absorción de nutrientes pertenecientes al saco vitelino, aunque el nivel de actividad aumentó cuando la larva inició su primera alimentación exógena (Zambonino-Infante, 1994b). En el dpe 18 se detectó un incremento significativo en la actividad de esta enzima, para luego disminuir su actividad hacia el dpe 20 y posteriormente volver a incrementar a partir del dpe 24 y mantenerse de esta manera hasta el final del estudio (dpe 40). Resultados similares a los nuestros fueron encontrados en rodaballo (Cousin *et al.*, 1987), lobina (Cahu y Zambonino, 1997) y Alvarez-González *et al.*, 2008), donde se observó un incremento significativo durante la etapa de su desarrollo y luego una disminución abrupta. Este tipo de fluctuaciones han sido relacionadas, junto con el incremento de las enzimas del borde de cepillo (fosfatasa alcalina), al momento en que se da la maduración de los enterocitos (Zambonino-Infante y Cahu, 2001). Asociado a esto, la caída en el nivel de actividad de leucina-aminopetidasa también se puede relacionar con la aparición de glándulas gástricas y el inicio de

la digestión de proteasas ácidas (pepsina) que tuvieron su aparición en el dpe 16 y un incremento significativo del nivel de actividad de pepsina el dpe 20, aunque no fue el máximo nivel de actividad de pepsina, también es probable que los cambios en el nivel de actividad de leucina-aminopeptidasa se relacionen más a una característica genética que a un efecto de los cambios de alimentación de nauplios de *Artemia* a dieta inerte (destete) (Zambonino-Infante y Cahu, 1996).

$\alpha$ -amilasa fue detectada a niveles muy bajos al momento de la eclosión en larvas de corvina blanca (dpe 1), resultados similares fueron encontrados para *P. californicus* (Álvarez-González *et al.*, 2006) y *P. maculatofasciatus* (Álvarez-González *et al.*, 2008). Esta actividad parece ser un componente integral del sistema enzimático de larvas de peces durante su desarrollo, porque se ha detectado al momento de su eclosión y su presencia no parece ser inducida por la dieta, si no que puede ser programada genéticamente. Sin embargo, el nivel de actividad de  $\alpha$ -amilasa puede cambiar dependiendo de la composición de la dieta (Moyano *et al.*, 1996; Peres *et al.*, 1998; Zambonino-Infante y Cahu, 2001), como fue observado en nuestro estudio, ya que un incremento significativo coincidió con el cambio de alimentación de nauplios de *Artemia* a la dieta inerte. Así mismo, los niveles de actividad de  $\alpha$ -amilasa durante el desarrollo temprano en larvas de corvina blanca quizá no fueron inducidos por el alimento vivo enriquecido y podrían ser mejor explicados como resultado de la actividad enzimática programada, de acuerdo a lo reportado por Zambonino-Infante y Cahu (2001). Así mismo, se podría proponer que debido a que el alimento vivo no ofreció un

substrato adecuado para amilasas, el nivel de actividad de esta enzima disminuyó significativamente.

Dos picos del nivel de actividad de  $\alpha$ -amilasa fueron observados: el primero se presentó al inicio del período de destete (dpe 16) y el segundo pico fue observado cuando las larvas fueron alimentadas exclusivamente con microdieta en el dpe 32. Estos incrementos en el nivel de actividad de  $\alpha$ -amilasa se pueden deber a la presencia de cierta cantidad de carbohidratos en las dietas formuladas para el destete de las larvas (Cara *et al.*, 2003).

# **CAPITULO 4**

## **Pargo lunarejo**

#### **4.0. Pargo lunarejo (*L. guttatus*)**

El pargo lunarejo (*L. guttatus*) (Figura 4) de la familia Lutjanidae, es una especie de pez marino que vive en arrecifes costeros, hasta 30 m de profundidad, es un organismo que se puede encontrar solitario o en grupos y forma grandes cardúmenes (Figura 4). Es una especie considerada con potencial de cultivo ya que alcanza precios de 60-70 pesos kg en producto fresco en los mercados locales, nacionales e internacionales. Su potencial de cultivo también radica en su demanda comercial, su capacidad de adaptación y el control de su reproducción en cautiverio (Ibarra-Castro y Duncan, 2007). Sin embargo, el cultivo a escala comercial se ha visto limitado, debido a la producción de larvas en cantidades importantes y uno de las causas es debido al desconocimiento de la fisiología digestiva en larvas de esta especie. El presente estudio tuvo como objetivo proporcionar información sobre la fisiología digestiva de larvas de pargo lunarejo mediante la medición de la transcripción de genes y actividad enzimática de tres de las principales proteasas digestivas, la tripsina, quimotripsina y la pepsina, y relacionarlos con el desarrollo del tracto digestivo y la secuencia de alimentación de las larvas.

#### **4.1. Protocolo de cultivo larvario de pargo lunarejo (*L. guttatus*)**

##### **4.1.1. Obtención de huevos y cultivo larvario**

Los huevos de pargo lunarejo se obtuvieron mediante inducción hormonal con hormonas liberadoras de gonadotropinas análogas (LHRHa) elaboradas en el

Laboratorio del Dr. Zohar (Universidad de Baltimore, Maryland, EUA). Las dosis que se aplicaron fueron determinadas en función del peso corporal y del nivel de desarrollo gonadal de los reproductores. Para la inducción se usaron implantes peritoneales de liberación hormonal lenta que se aplicaron detrás de la aleta dorsal con una jeringa con émbolo interno y aguja número G12. Los machos recibieron dosis menores de esta misma hormona, que en este caso se utilizan para aumentar el volumen espermático de los reproductores (Ibarra-Castro y Álvarez-Lajonchere, 2009).

#### **4.1.2. Recolecta de huevos de pargo lunarejo**

La colecta de huevos se realizó mediante colectores plásticos, que se colocaron a la salida del desagüe utilizado para el control del nivel del agua en los estanques de reproducción, una vez que se produjo el desove (aproximadamente 40 horas posteriores a la inducción). Posteriormente, usando una red con luz de malla de 100  $\mu\text{m}$  se procedió a separar los huevos con el mejor potencial para producir larvas viables, que se evaluó por su buena flotabilidad y su coloración ámbar tenue a rosado, de acuerdo a los criterios de Kjorsvik *et al.* (1990).

#### **4.1.3. Tanques de cultivo larvario**

Para el cultivo larvario se utilizaron tanques de fibra de vidrio de color negro con una capacidad de 600 litros (Figura 26). El agua fue filtrada por medio de cartucho con capacidad de retención de partículas de 100  $\mu\text{m}$  de diámetro y filtros de carbón activado, además el flujo de agua se trató con radiación ultravioleta.

**Mario A. Galaviz. Agosto 2011**

Durante el cultivo la temperatura del agua osciló entre 29 y 32 °C y la salinidad media fue  $34 \pm 1$  ups. El cultivo se mantuvo sin cambios de agua hasta el tercer día, a partir del cual se inició con un cambio diario del 50% aproximadamente hasta el dpe 10, cuando el cambio se incrementó hasta el 200%, llegando al 500% a partir del dpe 28 hasta terminar el experimento. La salida del control de nivel del agua central de los tanques se cubrió con mallas de diferente abertura para evitar el escape del alimento vivo y de las larvas, permitiendo al mismo tiempo el recambio de agua.



Figura 26. Sistema de tanques de fibra de vidrio utilizados durante el desarrollo del cultivo experimental de pargo lunarejo en las instalaciones del CIAD Unidad-Mazatlán (foto A. García-Ortega).

#### **4.1.4. Alimentación**

Las larvas se produjeron con protocolos de alimentación detallados en García-Ortega et al. (2005) y Abdo de la Parra *et al.* (2010), que se esquematizan en la Figura 27.

La alimentación consistió en cultivo de agua con microalgas a partir de dpe 0 hasta los 14 dpe, día en que se añadió a cada tanque de cultivo larvario una mezcla de 100,000 células  $\text{ml}^{-1}$  de *Nannochloropsis oculata* (*N. oculata*) y 50,000 células  $\text{ml}^{-1}$  de *Isochrysis* sp. Del 2 hasta el 6 dpe se añadieron a cada tanque 10 rotíferos  $\text{ml}^{-1}$  de la especie *Brachionus rotundiformis* previamente enriquecidos con microalgas. A partir del dpe 8 hasta el dpe 20, la cantidad de rotíferos disminuyó a 6  $\text{ml}^{-1}$ . A partir del dpe 2 se añadió al tanque de cultivo larvario una concentración de 0.5 copépodos  $\text{ml}^{-1}$  de las especies *Tisbe monozota* y *Pseudodiaptomus euryhalinus*, que se mantuvo constante hasta el dpe 18. En el dpe 18 se añadieron de igual manera al tanque de cultivo larvario 0.5 nauplios de *Artemia*  $\text{ml}^{-1}$  (A1 Selco™ INVE, Belgium) mismos que se incrementaron gradualmente hasta 1  $\text{ml}^{-1}$  conforme aumentaba la edad y desarrollo de las larvas (dpe 35). El cambio de alimentación de nauplios de *Artemia* a microdieta (destete) se realizó a partir del dpe 28, con una dieta comercial microparticulada (NRD 4/6 (400-600 $\mu\text{m}$ ), 5/8 (500-800  $\mu\text{m}$ ), 12/20 (>800  $\mu\text{m}$ ), INVE Aquaculture, Inc., Utah, USA) para terminar al dpe 35 dpe, reduciendo gradualmente el número de nauplios de *Artemia* 1  $\text{ml}^{-1}$ , hasta sustituirlos completamente por la dieta formulada.

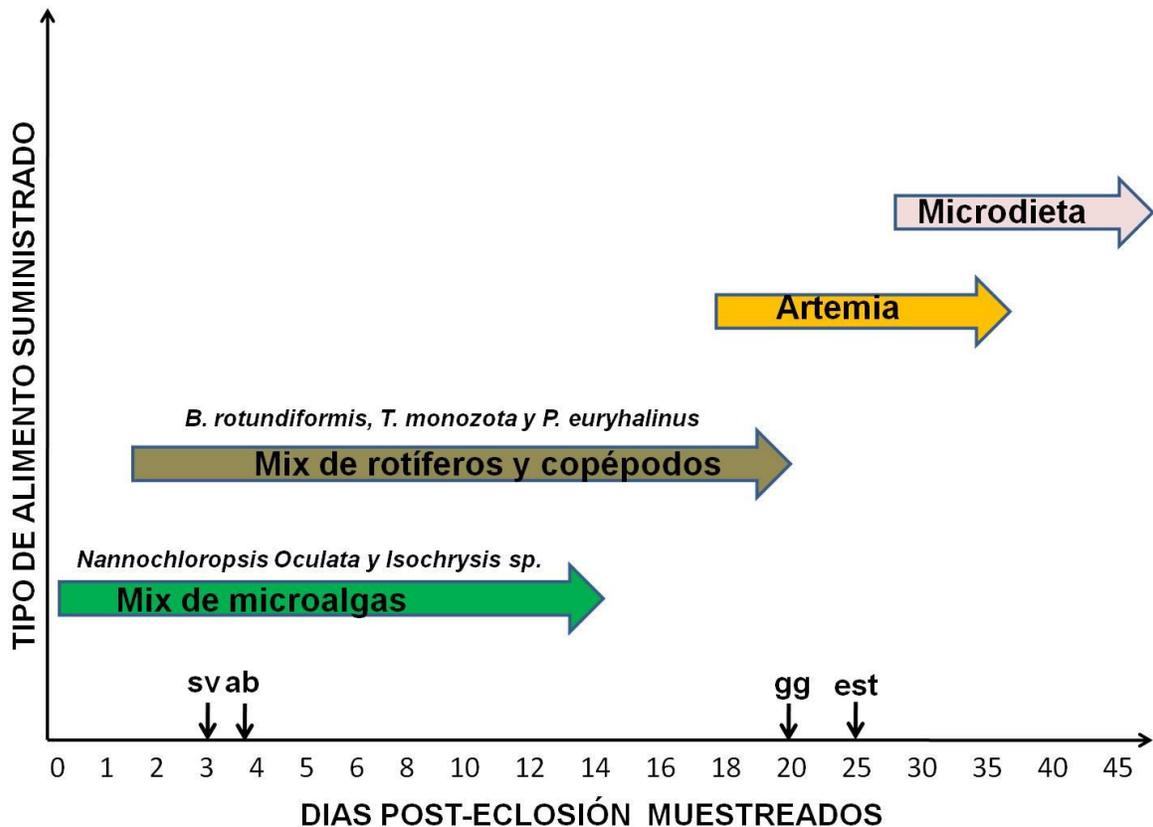


Figura 27. Protocolo de alimentación y toma de muestras durante el larvicultivo del pargo lunarejo (*L. guttatus*). Se indican los principales eventos que tuvieron lugar durante el desarrollo. ab: apertura de la boca; sv, absorción del saco vitelino; gg, aparición de glándulas gástricas; est, diferenciación del estómago funcional.

#### 4.1.5. Colecta de muestras para análisis histológico, bioquímico y molecular.

Dependiendo de su talla, se obtuvieron entre 20 y 50 larvas usando una red con luz de malla de 200  $\mu\text{m}$ . Las muestras se colectaron una hora después de la primera alimentación (8:00 horas), con el fin de evitar la presencia de enzimas provenientes del alimento vivo y la frecuencia de muestreo fue diaria desde el dpe 0 hasta el dpe 6, cada dos días hasta el dpe 20 y cada cinco días hasta el final del

estudio (dpe 40). Después de la colecta, las larvas fueron anestesiadas con tricaina metálsulfonato-MS 222, lavadas con agua destilada para remover el exceso de sales y almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

También se obtuvieron diariamente, a partir del dpe 0 hasta el dpe 40, muestras adicionales ( $n = 10-30$ ) que se usaron para medir la longitud total de 10 larvas bajo un microscopio con vernier electrónico y el peso húmedo medio individual, pesando tres submuestras de larvas ( $n=30$ ) con una balanza analítica (Sartorius, Gottingen, Alemania; precisión  $1 \cdot 10^{-4}$  g).

#### **4.2. Preparación de extractos enzimáticos (pargo)**

Los extractos enzimáticos se obtuvieron al macerar las muestras de eleuteroembriones, larvas y juveniles. En larvas mayores a 18 dpe se disecó el sistema digestivo con el propósito de eliminar los inhibidores enzimáticos que pudieran estar presentes en la musculatura, así como otras enzimas relacionadas con el metabolismo de las proteínas musculares y el sistema inmune (Hjelmeland, 1995).

En este caso, las disecciones se realizaron bajo un microscopio estereoscópico y de una lámpara con lupa sobre portaobjetos enfriados en una cama de hielo seco, con el fin de mantener las larvas a baja temperatura durante la disección. Cada muestra proveniente de la disección de 10 a 30 larvas (0-16 dpe) o de tres a cinco sistemas digestivos (a partir del día 18 dpe) se homogenizó en 1 ml de agua desionizada y en baño de hielo ( $4^{\circ}\text{C}$ ) utilizando un

homogenizador de tejidos Kontes (USA). Los homogenizados se centrifugaron a 14000 g durante 30 min a 4 °C, en una centrifuga refrigerada Biofuge Primo R marca Heraeus. El sobrenadante se utilizó como extracto enzimático y se separó en alícuotas de 200 µl que se almacenaron a -70 °C hasta su análisis (Figura 7, sección 2.2.1.).

#### **4.2.1. Determinación de proteína soluble**

La concentración de proteína soluble de cada muestra se determinó por triplicado de acuerdo a Bradford (1976). El desarrollo de la metodología se describe en la sección 2.2.2.

#### **4.2.3. Cuantificación de la actividad proteolítica**

La Tabla II (Sección 2.2.2.) indica los sustratos utilizados para cuantificar por espectrofotometría la actividad de algunas enzimas proteolíticas presentes en los extractos larvarios. A continuación se describe brevemente la metodología empleada.

**Actividad proteolítica ácida total (pepsina):** Para la medición de la actividad proteolítica ácida se utilizó una modificación de la metodología de Sarath *et al.* (1989). El desarrollo de la técnica se muestra en la sección 2.2.2.

**Actividad tipo tripsina:** Para la medición de la actividad tipo tripsina se utilizó una modificación de la metodología de Erlanger *et al.* (1961). El desarrollo de la técnica se muestra en la sección 2.2.2.

**Actividad tipo quimotripsina:** Para la medición de la actividad tipo quimotripsina se utilizó la metodología de Hummel (1959) con las modificaciones realizadas por Applebaum *et al.* (2001). El desarrollo de la técnica se muestra en la sección 2.2.2.

#### **4.2.4. Cálculo de actividades específicas.**

La actividad de un extracto problema se determinó utilizando las ecuaciones descritas en la sección 2.2.4.

### **4.3. Análisis histológico**

Para el estudio del desarrollo del sistema digestivo se usaron números de larvas diferentes dependiendo de su edad y talla, que fueron fijadas por 24 horas en solución de paraformaldehído 2% (preparada en solución amortiguadora de fosfatos, PBS), lavadas con agua destilada y posteriormente almacenadas en etanol 70% a 4 °C hasta su procesamiento.

Las muestras se deshidrataron en soluciones sucesivas de etanol, benceno y finalmente se incluyeron en parafina en un deshidratador de tejidos automático Leica TP 1040 en el laboratorio de histología de la Facultad de Ciencias en la Universidad Autónoma de Baja California, Campus Ensenada. Los bloques de parafina se cortaron sagitalmente en un micrótopo convencional (Leica-RM 2125 RT) en láminas de 4 y 5 µm de espesor, que se desparafinaron, rehidrataron en soluciones sucesivas de xileno, etanol y agua destilada y se tiñeron con hematoxilina-eosina (Humanson 1979). Las láminas se fotografiaron en una cámara digital PAXcam2 (Pax-it versión 6, Mis Inc., USA) software conectada a un

microscopio BH-2 Olympus (Japón), para posteriormente realizar la descripción del desarrollo del sistema digestivo de las larvas (Figura 8, sección 2.2.4).

#### **4.4. Análisis molecular**

##### **4.4.1. Clonación de genes de enzimas digestivas en larvas de pargo**

El análisis molecular se realizó según la metodología descrita por García-Gasca *et al.* (2006). El procedimiento detallado se muestra en la sección 2.2.5.

#### **4.5. Análisis estadístico**

La actividad específica e individual media de las enzimas digestivas de las larvas de diferente edad se compararon mediante pruebas de análisis de varianza de una vía (ANOVA) de acuerdo como se muestra en la sección 2.2.5.

#### **4.6. Resultados**

##### **4.6.1. Crecimiento larvario.**

El crecimiento en peso húmedo (mg) y en longitud total (mm) se muestra en la Figura 28. El crecimiento en peso fue lento desde el dpe 1 hasta el 20. A partir del dpe 25 se observó un incremento en forma exponencial hasta el final del experimento. En cuanto a la longitud, el crecimiento fue muy similar durante los

primeros 10 días, incrementándose en forma exponencial a partir del dpe 12, manteniéndose así hasta el final del experimento.

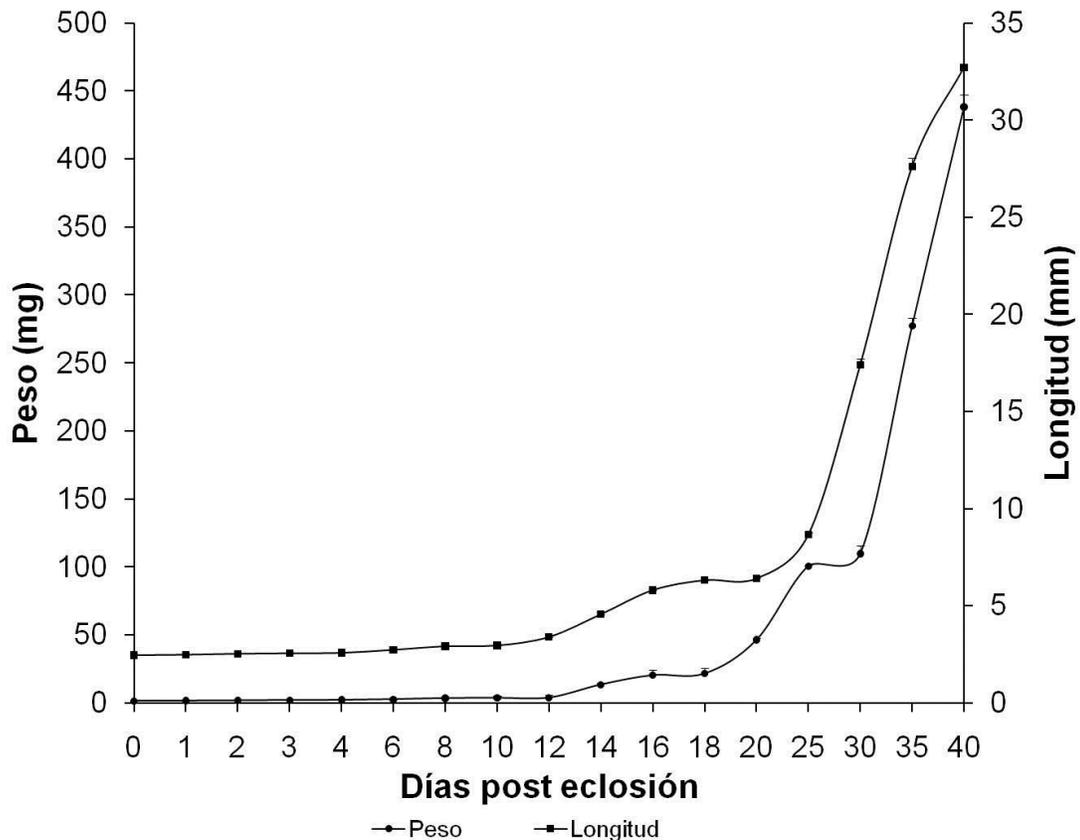


Figura 28. Longitud y peso del grupo de larvas de pargo (cm, mg/ larva  $\pm$  DE, n=3).

#### 4.6.2. Desarrollo del sistema digestivo y órganos asociados.

Al momento de la eclosión ( $1.41 \pm 0.34$  mg peso húmedo), las larvas de pargo lunarejo presentaron un tracto digestivo incipiente, recto, indiferenciado y cerrado en la parte anterior y posterior, ubicado en posición dorsal con respecto al saco vitelino. Su lumen estaba cerrado en la parte media, probablemente por la presión ejercida por el vitelo.

El saco vitelino, que ocupaba la mayor parte de la cavidad abdominal, se caracterizó por ser contener una concentración alta acidofílica (Figura 29A). Durante la absorción del saco vitelino (2-3 dpe,  $1.98 \pm 0.25$  mg) iniciaron los cambios morfológicos de los órganos del sistema digestivo (bucofaringe, esófago corto, intestino y glándulas digestivas accesorias). Entre los días 3 y 4 dpe ( $2.06 \pm 0.17$  mg) se observó la abertura de la boca, y el intestino posterior se separó de la parte anterior por la válvula intestinal (Figura 29B).

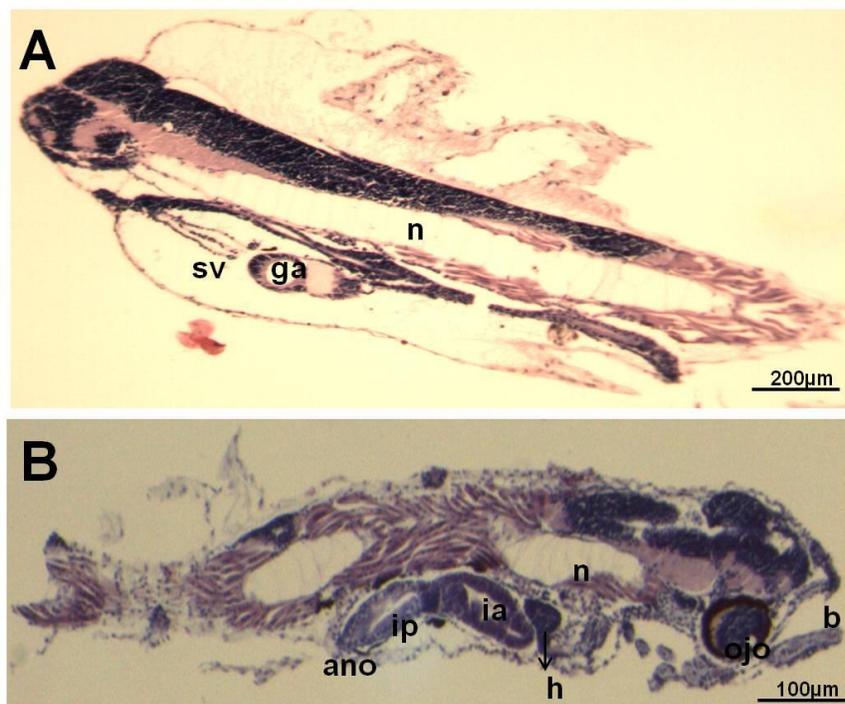


Figura 29. Sección sagital de larvas de pargo lunarejo. (A) larvas 1 dpe, (B) larvas dpe 3. b, boca; ga, gota de aceite; ia, intestino anterior; ip, intestino posterior; n, notocordio; ojo; sv, saco vitelino, td, tubo digestivo. Tinción hematoxilina-eosina.

No se observaron diferencias histológicas entre el intestino anterior y posterior; ambas regiones estaban cubiertas por un epitelio columnar simple con

núcleos basales, poco citoplasma basófilo y microvellosidades eosinófilas. Durante este período, el hígado continuó diferenciándose y apareció como una masa de tejido compacto de hepatocitos poliédricos con núcleo central y citoplasma eosinófilo reducido. Además, en esta etapa fueron visibles varios grupos pequeños de células basófilas pancreáticas (páncreas exocrino) con gránulos de zimógeno.

Desde el inicio de la primera alimentación exógena el sistema digestivo creció en talla y complejidad histológica hasta el dpe 10 ( $3.6 \pm 1.25$  mg), (Figura 30A). En particular, se observó el esófago diferenciado en un epitelio con células caliciformes cúbicas simples muy dispersas que crecieron en longitud conectando la faringe con el intestino anterior. Además el intestino acomodado en forma de lazo (loop) incrementó la longitud del tracto digestivo en el interior de la cavidad abdominal y la mucosa intestinal presentó varios pliegues. A esta edad el plegamiento de la mucosa intestinal de las larvas fue más notable en el intestino anterior que en el posterior.

En cuanto a las glándulas digestivas anexas, los hepatocitos se organizaron en torno a las sinusoides hepáticas y del conducto biliar cubierto por un epitelio cúbico simple, mientras que el páncreas exocrino fue visible como un tejido extrahepático formado por células pancreáticas organizadas en acinos pancreáticos prominentes con grandes gránulos de zimógeno. No se observaron inclusiones lipídicas en el hígado, ni en el intestino.

En el dpe 18 ( $22.5 \pm 4.24$  mg) la característica del desarrollo del sistema digestivo más relevante fue la aparición de lo que sería el estómago que se mostró como un cuerpo de células cubicas basófilas al final del esófago (Figura 30B). Durante este mismo período (dpe 18), se observaron también el plegamiento longitudinal de la mucosa del esófago, el incremento del número de células caliciformes epiteliales, así como el aumento en el tamaño y el número de pliegues de la mucosa intestinal.

En el dpe 20 ( $46.33 \pm 1.52$  mg), las glándulas gástricas se visualizaron con claridad (Figura 30C y 30D), mientras que en el dpe 25 ( $100.5 \pm 0.70$  mg) el estómago resultó diferenciado morfológicamente y con tres regiones histológicamente distintas: la cardíaca, la fúndica y la pilórica. La región cardíaca mostró una reducción del número de pliegues de la mucosa y su lumen estuvo bordeado por un epitelio simple corto con los núcleos basales. Esta región del estómago estaba rodeada por una fina capa muscular lisa circular.

La región fúndica ocupó la mayor parte del estómago y estuvo bordeada por un gran epitelio cilíndrico ciliado y un gran número de glándulas gástricas, mientras que la pilórica fue corta y cubierta por un epitelio columnar provisto de glándulas gástricas. El estómago se observó separado desde el intestino a través de los ciegos pilóricos.

Otro rasgo histológico importante observado en larvas de pargo lunarejo de acuerdo al desarrollo y a la edad fue el incremento en la acumulación de vacuolas

lipídicas en los hepatocitos, que no se observaron en edades más tempranas (Figura 31A).

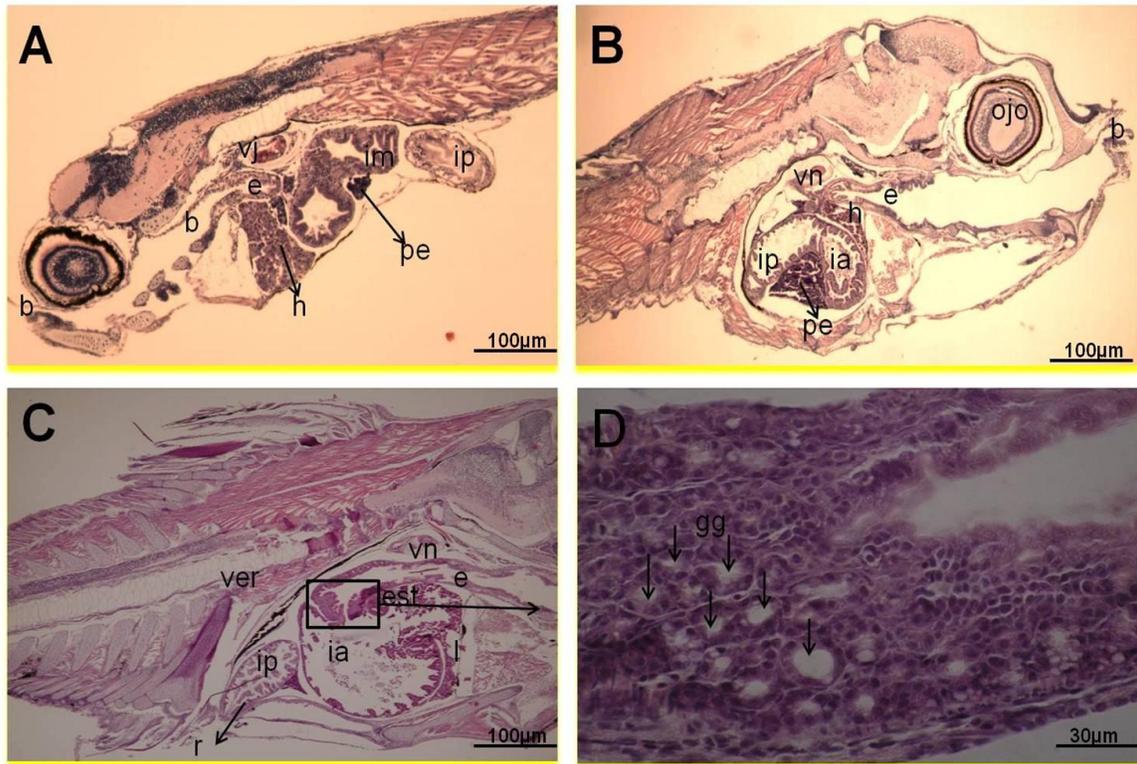


Figura 30. Secciones sagitales en larvas de pargo lunarejo. (A) larvas dpe 10, (B) larvas dpe 18, (C) y (D) larvas dpe 20. b, boca; bc, bucofaringe; e, esófago; est, estómago; gg, glándulas gástricas; h, hígado; ia, intestino anterior; ip, intestino posterior; ojo; pe, páncreas exocrino; r, recto; ver, vertebra; vn, vejiga natatoria Flechas indican gg. Tinción hematoxilina-eosina.

En el dpe 30 ( $109.73 \pm 5.74$  mg) se observaron ciegos pilóricos rudimentarios alrededor del estómago (Figura 31B), además los niveles de lípidos y glicógeno depositados en el hígado continuaron incrementando hasta el final del estudio (dpe 40,  $438.2 \pm 9.28$  mg). Así mismo, se observaron en el hígado numerosas

vacuolas lipídicas con probable función de depósito de glicógeno y lípidos (Figura 31C).

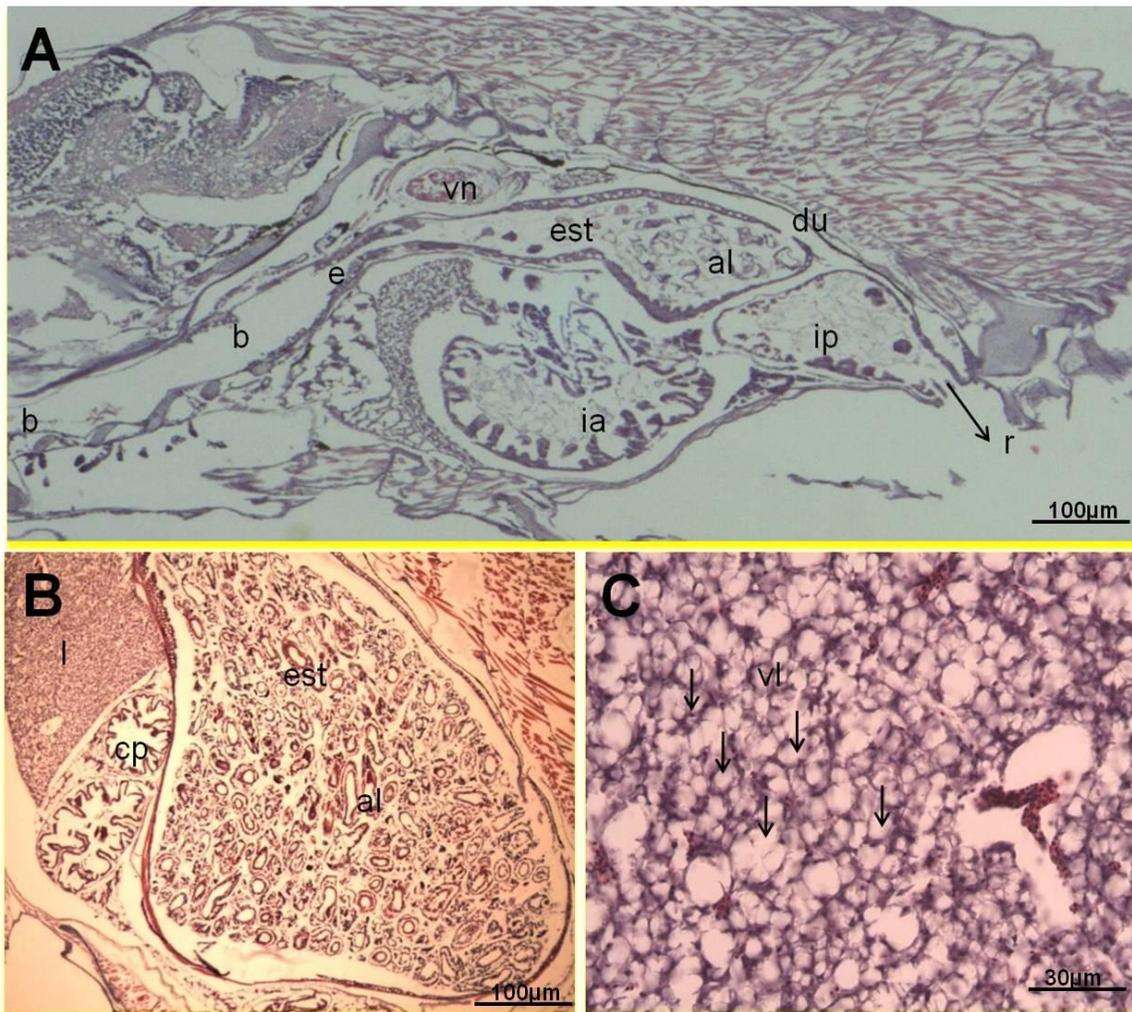


Figura 31. Sección sagital de larvas de pargo lunarejo. (A) larvas dpe 25, (B) larvas dpe 30 y (C) larvas dpe 40. Abreviaciones: al, alimento; b, boca, bc, bucofaríngeo; cp, ciegos pilóricos; du, ducto urinario; e, esófago; est, estómago; h, hígado; ia, intestino anterior; ip, intestino posterior; vl, vacuolas lipídicas; vn, vejiga natatoria. Flechas indican vl. Tinción hematoxilina-eosina.

#### 4.6-3. Clonación y secuenciación parcial de las enzimas digestivas tripsina, quimotripsina y pepsina en larvas de pargo lunarejo.

Se obtuvieron secuencias parciales de enzimas de totoaba, estas se sometieron al banco de genes Genbank (Tabla V).

**Tabla V. Secuencias nucleotídicas parciales de enzimas digestivas obtenidas en larvas de pargo lunarejo.**

---

**>Tripsina (383 bases) GenBank HM754476**

---

AATGACATCATGCTGATCAAGCTGACCAAGCCCGCCACCCTCAACCAGTACG  
TGCAGCCTGTGGCTCTGCCACCAGCTGTGCTCCCGCTGGCACCATGTGCAC  
AGTCTCTGGCTGGGGCAACACCATGAGCTCCACTGCTGACAGAAACCAGCTG  
CAGTGCCTGAACATCCCCATCCTGTCCGACAGGGACTGTGACAACTCCTATC  
CTGGCATGATCACTGACGCCATGTTCTGCGCTGGATACCTGGAGGGCGGCAA  
GGACTCTTGCCAGGGTGACTCTGGTGGCCCCGTCGTGTGCAACGGTGAGCTG  
CAGGGTGTGTGTCCTGGGGCTACGGATGTGCTGAGAGGGACCACCGCGGTG  
TCTACGCCAGGGTCTACATC

---

**>Quimotripsina (216 bases) GenBank HM754477**

---

CTGGCCCTGGCAGATCTCTCTGCAGTATGAGAGGGACGGTGTGTGGAGGCAC  
ACTTGTGGGGGATCTCTGATTGCTGCCAACTGGGTTCATGACTGCTGCTCACT  
GCATCAACACCAAGTTGTGCTACAGGGTGTTTGTGGGCAAATACAACCTGGT  
CGAGGAAGAAGCTGGCTCCAAGGCCATTGTGCCTGAGAAGATTGTCGTCCAT  
GAGAAATG

---

**>Pepsina (470 bases) GenBank HM754478**

---

TCACCAGTCATGCTCACTCAAGTGGGGCAACCAGCAACTGTCCATCCAATAC  
GGCACTGGCAGCATGACCGGATATCTGGCCAGCGACACTGTTGAGGTGGGCG  
GCATCACTGTGGTCAACCAGGTGTTTGGAAATCAGCCAATGCAAGGCTGCCTT  
CATGGCTCACATGACTGCTGACGGCATCCTGGGATTGGCCTTCCAGTCCATC  
GCCTCTGACAACGTCGTGCCTGTCTTCGACAACATGATCAAGCAGAACCTGG  
TGTCCCAGCCAATGTTCTCTGTCTACCTGAGCGGTAACAGCCAGCAGGGCAG  
TGAGGTGGTCTCGCGCAGTATCGACAGCAGCCACTACACTGGACAAGTCACC  
TGGATCCCTCTGACCTCTGCCACCTACTGGCAGATCAAGATGGACAGCGTTA  
CCATCAACGGACAGACCGTTGCCTGCTCCGGTGGCTGCCAGCCATCATCGA  
CA

---

**>18S-Rib (443 bases) GenBank HM754479**

---

GGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATCTTAAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTC  
 GTAGTTGGACCTCGGGATCGAGCTGACGGTCCGCCGCGAGGCGAGCTACCGT  
 CTGTCCCAGCCCCTGCCTCTCTCCGCGCCCTCGATGCTCTTAGCTGAGTGTC  
 CCGCGGGGGCCGAAGCGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGC  
 CCGGTCGTCTGAATACCGCAGCTAGGAATAATGGAATAGGTCTCCGGTTCTA  
 TTTTGTGGGTTTCTCTCTCTGAACTGGGGCCATGATTAAGAGGGACGGCCGG  
 GGGCATTTCGTATTGTGCCGCTAGAGGTGAAATACTTGGACCGGCGCAAGACG  
 GACGAAAGCGAAAGCATTGCGCAAGAATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAG  
 TCGGAGGTTTCGACGACGATCAGATACC

A partir de estas secuencias se diseñaron los siguientes oligos específicos por medio del programa PRIMER3, para amplificarlas por tiempo real (Tabla VI).

Tabla VI. Primers específicos diseñados para amplificar tripsina, quimotripsina, pepsina y 18s rRNA en larvas de pargo lunarejo.

<b>Primers específicos</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Número de acceso</b>
LgTryp-F	5'ATG AGC TCC ACT GCT GAC AGA AAC 3'	HM754476
LgTryp-R	5'AGA GTC ACC CTG GCA AGA GTC CTT 3'	
LgChemo-F	5'CTG CAG TAT GAG AGG GAC GGT GT 3'	HM754477
LgChemo-R	5'TTT GCC CAC AAA CAC CCT GTA G 3'	
LgPepsin-F	5'TGT CTT CGA CAA CAT GAT CAA GCA 3'	HM754478
LgPepsin-R	5'GCT GTC CAT CTT GAT CTG CCA GTA 3'	
Lg18sRib-F	5'CTG AAC TGG GGC CAT GAT TAA GAG 3'	HM754479
Lg18sRib-R	5'GGT ATC TGA TCG TCG TCG AAC CTC 5'	

#### **4.6.4. Expresión y actividad de enzimas digestivas**

#### **4.6.4.1. Tripsina**

La expresión de ARNm de tripsina se detectó a un nivel muy bajo en el dpe 1, la cual incrementando hacia el dpe 3 coincidiendo con el inicio de la alimentación a base de rotíferos y copépodos (Figura 32A). El nivel de expresión volvió a incrementar significativamente ( $P < 0.35$ ) en el dpe 18 cuando la alimentación cambió de rotíferos-copépodos a nauplios de *Artemia*; así mismo, en este período se observaron completamente desarrollados el páncreas, el intestino y el hígado.

El máximo nivel de ARNm de tripsina fue detectado ( $P > 0.001$ ) en el dpe 25, cuando las glándulas gástricas y el estómago se observaron completamente desarrollados, no obstante que las larvas se estaban todavía alimentando con nauplios de *Artemia*. Este nivel disminuyó significativamente ( $P < 0.006$ ) al inicio del periodo de cambio de alimentación de nauplios de *Artemia* a microdieta (dpe 30) (Figura 32A).

La actividad específica de tripsina fue detectada inicialmente en el dpe 1 ( $0.54 \pm 0.07$  mU/mg proteína), y el nivel se mantuvo bajo durante los siguientes días. Sin embargo, se observó un incremento significativo ( $P < 0.001$ ) en el dpe 18 ( $1.70 \pm 0.29$  mU/mg proteína), cuando se cambió el régimen de alimentación de rotíferos-copépodos a nauplios de *Artemia*, aunque después de este día, la actividad disminuyó (dpe 20,  $1.11 \pm 0.06$  mU/mg proteína), incrementando nuevamente en el dpe 25 ( $2.04 \pm 0.44$  mU/mg proteína,  $P < 0.001$ ), y alcanzando el

máximo nivel en el dpe 35 ( $6.36 \pm 0.02$  mU/mg proteína). Después de este período el nivel de actividad se mantuvo constante hasta el final del estudio (Figura 32B).

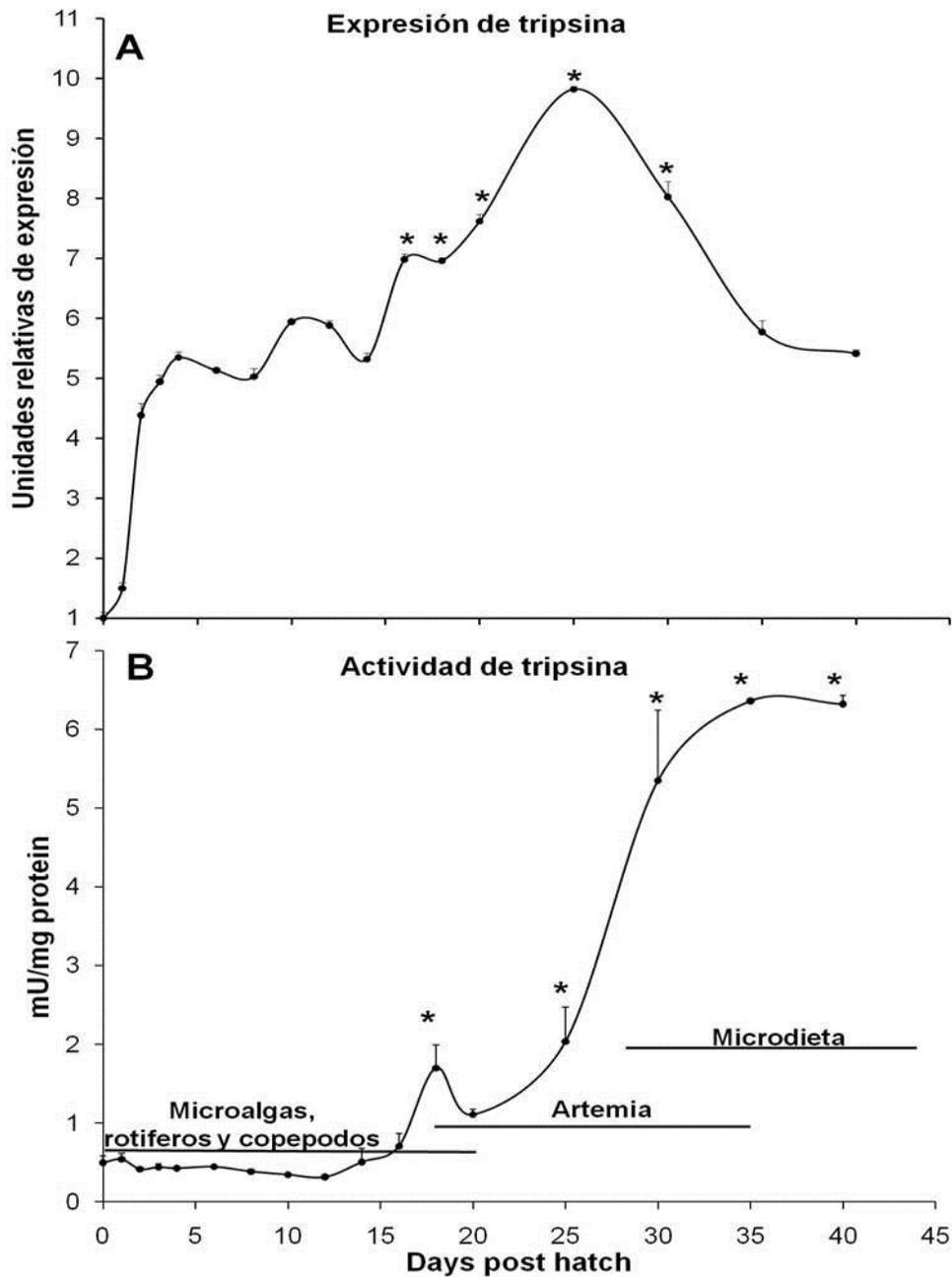


Figura 32. Expresión y actividad de tripsina durante el desarrollo larvario del pargo lunarejo (Media  $\pm$  DE, n=3). Asteriscos (\*) indican diferencias significativas en el tiempo.

#### **4.6.5.2. Quimotripsina**

La expresión de quimotripsina se detectó en el dpe 1, observándose algunos cambios en el nivel de expresión, ninguno de los cuales fue significativo ( $P > 0.05$ ) (Figura 33A), coincidiendo con la apertura de la boca (dpe 3), con el cambio de alimentación con una mezcla de rotíferos-copépodos (dpe 10) y finalmente con la alimentación con nauplios de *Artemia* (dpe 25).

En cambio, si se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la actividad específica de quimotripsina (Figura 33B), la cual se detectó a partir del dpe 1 ( $0.6 \pm 0.28 \text{ mU} \times 10^{-4} / \text{mg}$  proteína), aumentando significativamente ( $P < 0.001$ ) el dpe 18 ( $9.45 \pm 1.12 \text{ mU} \times 10^{-4} / \text{mg}$  proteína), coincidiendo con el inicio de la alimentación a base de nauplios de *Artemia*. Un nuevo incremento significativo ( $P < 0.001$ ) fue observado en el dpe 25 ( $24.89 \pm 1.29 \text{ mU} \times 10^{-4} / \text{mg}$  proteína) tres días antes del inicio del cambio de alimentación de nauplios de *Artemia* a microdieta. Después de este día, la actividad de quimotripsina disminuyó hasta el dpe 40 ( $1.68 \pm 0.7 \text{ mU} \times 10^{-4} / \text{mg}$  proteína).

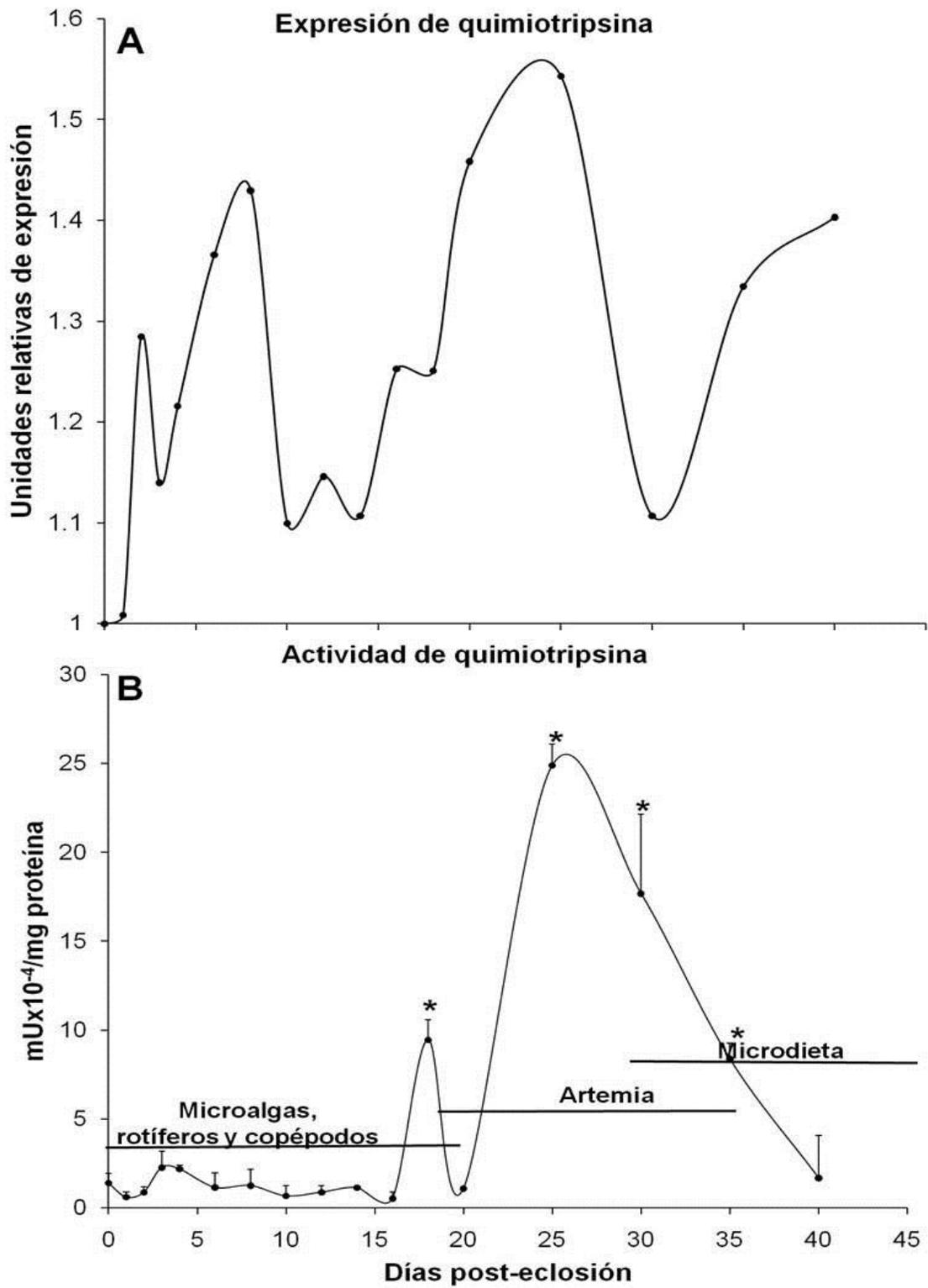


Figura 33. Expresión y actividad de quimotripsina en larvas de pargo lunarejo durante su desarrollo larvario (Media  $\pm$ DE n=3). (\*) Indican diferencias significativas en el tiempo.

#### **4.6.5.3. Pepsina**

A lo largo de la ontogenia larval del pargo lunarejo se encontraron algunas diferencias significativas del nivel de expresión de pepsina ( $P < 0.001$ ), al inicio los niveles de pepsina fueron bajos los cuales aumentaron significativamente en el dpe 18 ( $P < 0.001$ ), dos días antes de la aparición de las glándulas gástricas (Figura 34A). El máximo nivel de expresión fue detectado en el dpe 25 ( $P < 0.001$ ), coincidiendo con el desarrollo completo del estómago, después del cual el nivel disminuyó en el dpe 30 y se mantuvo constante hasta el final del experimento (Figura 34A).

La actividad específica de pepsina fue detectada a partir del dpe 12, aunque con un nivel muy bajo ( $0.65 \pm 0.16$  U/mg proteína). Durante los siguientes días se registraron varios incrementos significativos ( $P < 0.05$ ). El primero se observó en el dpe 20 ( $3.16 \pm 0.60$  U/mg proteína  $P = 0.038$ ) coincidiendo con la diferenciación de las glándulas gástricas. Desde entonces, la actividad específica de pepsina se mantuvo constante hasta el dpe 30 ( $3.7 \pm 0.2$  U/mg proteína), incrementó de nuevo el dpe 35 ( $5.89 \pm 0.4$  U/mg proteína) y posteriormente disminuyó hasta el final del estudio ( $P > 0.05$ ) (Figura 34B).

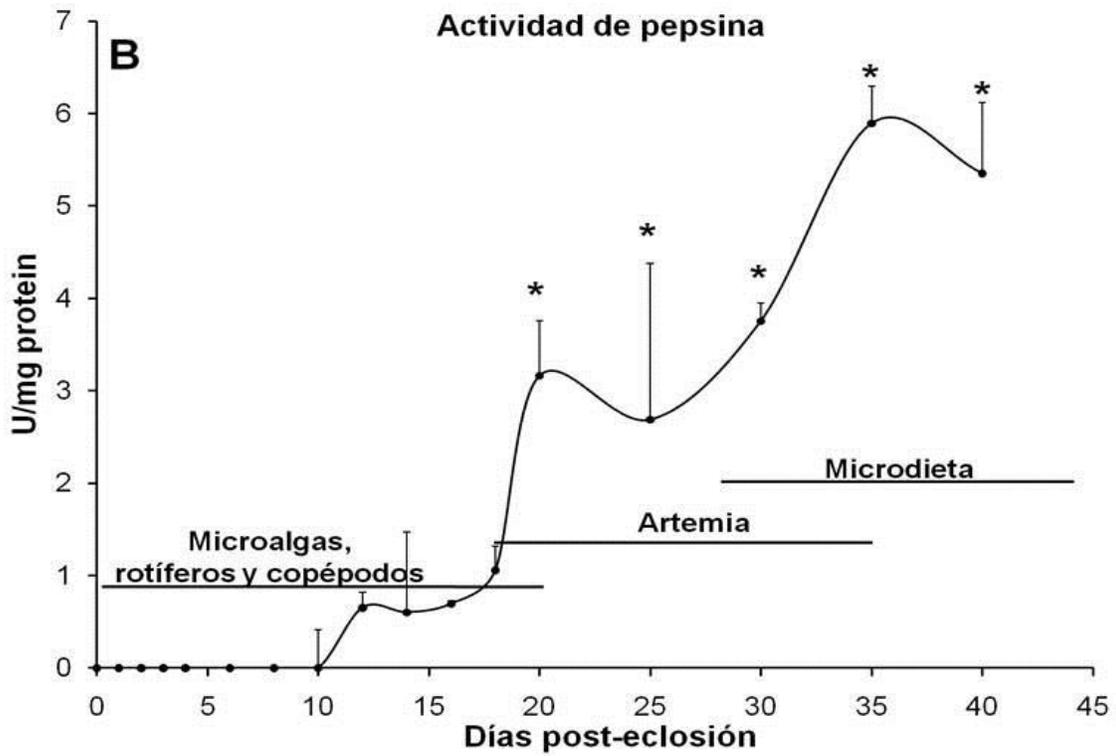
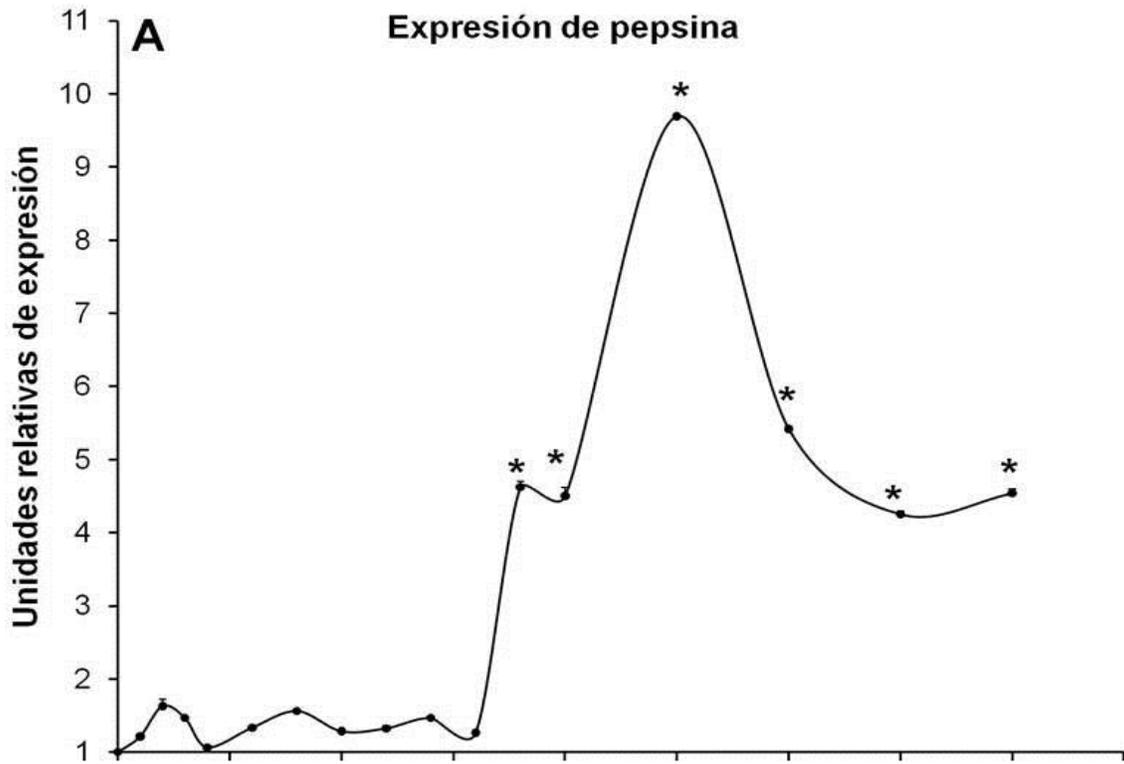


Figura 34. Expresión y actividad de pepsina en larvas de pargo lunarejo durante su desarrollo larvario (Media  $\pm$ DE n=3). (\*) Indican diferencias significativas en el tiempo.

#### **4.7. DISCUSIÓN**

La digestión de las proteínas se produce principalmente por la actividad de las proteasas alcalinas, como tripsina, quimotripsina y peptidasas citosólicas (Zambonino-Infante y Cahu, 2001; Zambonino-Infante *et al.*, 2008). Durante las etapas larvales, estas enzimas tienen una capacidad limitada para digerir macromoléculas que son absorbidas por pinocitosis de los enterocitos en el intestino posterior para su digestión intracelular. En las especies con estómago funcional, el procesamiento de alimentos implica una digestión ácida y por lo tanto una digestión extracelular más eficiente (Segner *et al.*, 1994). Las glándulas gástricas se han podido detectar de unos días o hasta semanas después de la eclosión y su número ha mostrado aumentar progresivamente cubriendo parcial o total el epitelio del estómago, sin embargo, este tipo de recubrimiento depende de la especie (Ribeiro *et al.*, 1999; Ortiz-Delgado *et al.*, 2003; Elbal *et al.*, 2004). En consecuencia, las secreciones de pepsinógeno y ácido clorhídrico, al igual de la conversión de pepsinógeno a pepsina, son inducidas en un entorno de valores cada vez más bajos de pH en el lumen del estómago (Yúfera *et al.*, 2004; Yúfera y Darias, 2007). El tiempo de aparición de glándulas gástricas, su número final y regiones cubiertas del estómago varían entre las familias y especies (Falk-Petersen, 2005). Esas características están relacionadas con la preferencia y hábitos alimenticios de cada especie. Además de la aparición de la digestión

ácida, el incremento en el nivel de actividad de aminopeptidasa en las membranas del borde en cepillo intestinal y la disminución progresiva de las peptidasas citosólicas ha caracterizado la maduración de los enterocitos (Zambonino-Infante y Cahu, 2001).

El desarrollo del sistema digestivo en larvas de pargo lunarejo fue muy similar a otras especies marinas como *S. aurata* (Sarasquete *et al.*, 1995), *P. californicus* (Gisbert *et al.*, 2004), *S. annulatus* (García-Gasca *et al.*, 2006), *D. labrax* (Giffard-Mena *et al.*, 2006), *A. nobilis* (Galaviz *et al.*, 2011), entre otras especies de peces marinos, en las cuales el tubo digestivo (bucofaríngeo, esófago, intestino y recto) se diferenció alrededor del dpe 3, coincidiendo con la apertura de la boca y el inicio de la primera alimentación exógena.

Resultados similares fueron observados en nuestro estudio entre el dpe 3-4, cuando las larvas de pargo lunarejo experimentaron importantes cambios histomorfológicos del sistema digestivo, incluyendo el plegamiento de la mucosa intestinal, el desarrollo del hígado, bucofaríngeo y el esófago y la diferenciación de los enterocitos la cual, de acuerdo a Segner *et al.* (1994) indica que el intestino ya posee la capacidad de absorción de nutrientes y por tanto señala el posible inicio de la alimentación exógena.

La expresión y actividad de tripsina en larvas de pargo lunarejo fue detectada al momento de la eclosión a niveles muy bajos, incrementando con el desarrollo de la larva. Estos resultados coinciden con lo reportado para otras

especies de peces (Baragi y Lovell 1986; Pedersen 1993; Walford y Lam 1993; Oozeki y Bailey 1995; Moyano *et al.*, 1996; Ribeiro *et al.*, 1999; Lazo *et al.*, 2000; Zambonino-Infante y Cahu, 1994). Así mismo, Zambonino-Infante y Cahu (1994) detectaron actividad enzimática de tripsina y otras enzimas digestivas en larvas de *D. labrax* en el dpe 4, cuando la primera alimentación fue provista en el dpe 6. La actividad enzimática de tripsina antes de la primera alimentación sugiere que la actividad de esta enzima se deriva de una expresión programada genéticamente y no por la primera alimentación exógena (Peres *et al.*, 1998; Ribeiro *et al.*, 1999; Lazo *et al.* 2000; Zambonino-Infante y Cahu 2001; Álvarez-González *et al.*, 2006, 2008).

Zambonino-Infante y Cahu (2001) mencionan que la secreción de enzimas pancreáticas en el lumen intestinal incrementó durante las primeras tres semanas de vida de la larva, al menos en especies de peces que viven en ambientes de aguas templadas; este proceso es normal, tomando en cuenta, la maduración del páncreas en su forma exocrina y la producción de de gránulos de zimógeno. De acuerdo a García-Gasca *et al.* (2006), el tiempo para la síntesis de la tripsina y la actividad enzimática es específico de cada especie, la cual depende del desarrollo de la etapa larval y del tipo de alimentación exógena.

En larvas de pargo lunarejo, los picos de expresión de tripsina preceden los picos de actividad enzimática específica, los cuales generalmente coinciden con los cambios de alimentación. La expresión del gen de tripsina incrementó con el desarrollo y edad de la larva, iniciando en el dpe 3, mostrando un nivel máximo de

expresión al dpe 25, mientras que la actividad enzimática mostró su máximo nivel 10 días después (dpe 35) sugiriendo que el páncreas fue completamente funcional después del dpe 25. La síntesis y secreción eficientes de los gránulos de zimógeno juegan un papel importante en la hidrólisis de la proteína del alimento y la activación de otras enzimas (Hjelmenland y Jorgensen 1985).

En larvas de pargo lunarejo, el estómago fue completamente desarrollado al dpe 25. Un incremento notable de expresión del gen de pepsina fue observado el dpe 18, mientras que la actividad enzimática fue detectada hasta el dpe 20. El segundo incremento significativo de expresión de pepsina fue observado en el dpe 25, mientras que el incremento en la actividad enzimática fue detectado en el dpe 35. Estos resultados indican que el estómago se encuentra completamente desarrollado después del dpe 25. Diferencias entre el tiempo de aparición de las glándulas gástricas y el tiempo de secreción de pepsina han sido observadas en algunas especies de larvas de peces marinos como *D. labrax* (Vu, 1983), *S. senegalensis* (Ribeiro et al., 1999), y *P. californicus* (Álvarez-González et al., 2006). En larvas de pargo lunarejo, el primer pico de actividad de pepsina al dpe 20 coincide con la aparición de las glándulas gástricas, mientras un incremento significativo en la expresión del gen de pepsina fue detectada dos días antes de la aparición de las glándulas gástricas (dpe 18), esta diferencia podría atribuirse al hecho de que la síntesis de la enzima en forma inactiva (pepsinógeno) se produjo dos días antes de la enzima se active.

Zambonino-Infante y Cahu (2007) demostraron que la diferenciación de las glándulas gástricas no es necesaria para iniciar la alimentación a base de dietas formuladas, ya que los autores obtuvieron con éxito el cultivo experimental de larvas de lobina europea alimentadas con dieta formulada al momento de la primera alimentación exógena. Sin embargo, de acuerdo a nuestros resultados, en larvas de pargo lunarejo no se aconseja el cambio de alimento vivo a alimento inerte (destete) antes de la diferenciación de las glándulas gástricas. Sugerimos que el destete se puede realizar entre 20 y 25 dpe en lugar del protocolo actual de destete de 28 a 30 dpe.

# **CAPITULO 5**

## **Conclusiones**

## **5.0. Conclusiones**

### **5.1. Totoaba**

En larvas de totoaba, el sistema digestivo esta completamente desarrollado y es funcional entre los dpe 24 y 28, ya que mediante análisis bioquímicos y moleculares se cuantificaron tres de las principales enzimas digestivas relacionadas con la digestión de proteínas en la dieta, proporcionando así información relevante para esta especie, ya que actualmente no se cuenta con información detallada sobre la fisiología digestiva y protocolos de alimentación adecuados para *T. macdonaldi*. Entre los dpe 24 y 28, las larvas son capaces de digerir dieta formulada y absorber los nutrientes de la misma, por lo tanto, basándonos en los resultados obtenidos y bajo las condiciones experimentales en que se realizó este estudio, se propone estandarizar el inicio del período del destete a partir del dpe 24.

### **5.2. Corvina**

En larvas de corvina blanca, el estómago es funcional entre los dpe 16 y 18. En este tiempo la larva ha desarrollado completamente el sistema digestivo, lo cual nos indica que la larva está capacitada para poder digerir una dieta formulada y poder absorber los nutrientes y, por lo tanto, no depender de alimento vivo para su nutrición. Basándonos en los resultados obtenidos en el presente estudio de *A. nobilis*, se sugiere iniciar con el periodo de destete a partir del dpe 16.

### **5.3. Pargo**

En larvas de pargo lunarejo, el sistema digestivo esta completamente desarrollado y funcional entre los dpe 20 y 25, lo cual ha sido demostrado mediante observaciones histológicas y la cuantificación bioquímica de tres de las principales proteasas digestivas como tripsina, quimotripsina y pepsina. En este tiempo las larvas son capaces de digerir dieta formulada y absorber los nutrientes de la misma, por lo tanto, basándonos en los resultados obtenidos de *L. guttatus*, el inicio del período del destete podría ser adelantado del dpe 28-30 que actualmente se maneja en el criadero de peces marinos del CIAD al dpe 20-25.

Con base en el trabajo de Moyano *et al.* (1996) con larvas de la dorada y la información publicada por varios autores que realizaron estudios con diferentes especies de larvas de peces marinos, así mismo, con estudios sobre fisiología digestiva con especies de peces marinos estudiados en México se elaboró un diagrama donde se muestra la aparición de las proteasas alcalinas y funcionalidad estomacal de larvas de diferentes especies marinas y las larvas de totoaba, corvina blanca y pargo lunarejo, así como los estadios de desarrollo a lo largo del tiempo, comparándolas con las de otras especies de peces.(Figura 35).

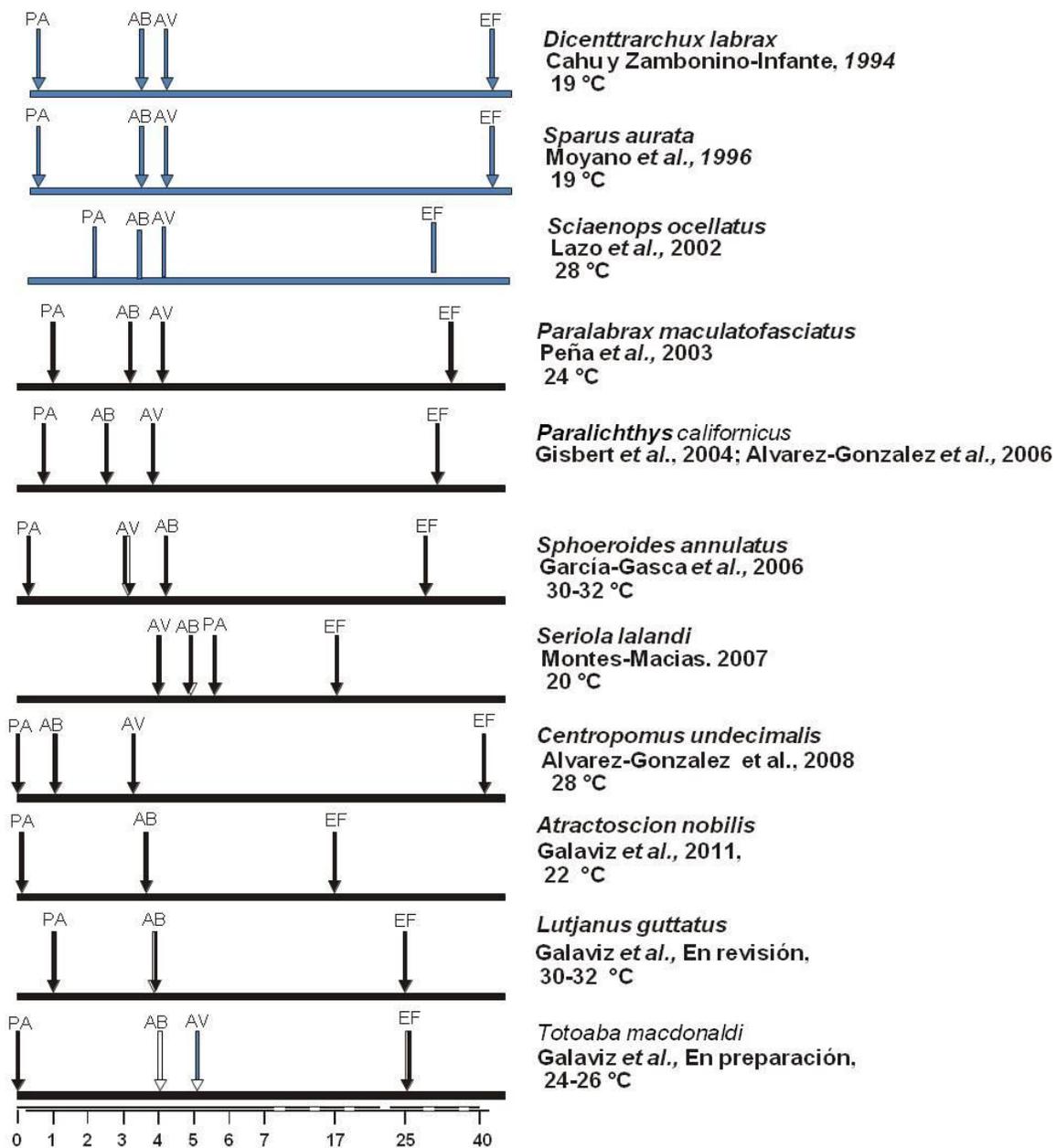


Figura 35. Comparación de los estadios de desarrollo en el tracto digestivo de varias especies de peces. AP: actividad proteasa alcalina (tripsina y quimotripsina); AB: apertura de boca; AV: absorción de vitelo; EF: estómago funcional.

Los conocimientos obtenidos en el presente trabajo de tesis constituyen un aporte importante para el desarrollo del cultivo larvario de especies como totoaba

(*T. macdoandli*), corvina blanca (*A. nobilis*) y pargo lunarejo (*L. guttatus*). Abren la factibilidad de cultivo de estas especies en las costas mexicanas, tal y como se hacen con otras especies de peces marinos en otros países, El éxito de dichos desarrollos tecnológicos se basan en un buen control y conocimiento exhaustivo del proceso de alimentación, digestión y nutrición durante el desarrollo fisiológico digestivo en peces.

#### **5.4. BIBLIOGRAFIA**

Abdo-de la Parra, M.I., Rodríguez-Ibarra, E., Campillo-Martínez, F., Velasco-Blanco, G., García-Aguilar, N., Álvarez-Lajonchère, L.S., Voltolina, D. 2010. Efecto de la densidad de siembra sobre el crecimiento y supervivencia larval del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*. Revista de Biología Marina y Oceanografía 45, 141-146.

Alarcón-López, F.J. 1997. Procesos digestivos en peces marinos: Caracterización y aplicaciones prácticas. Tesis de doctorado. Universidad de Almería. Departamento de Biología Aplicada. Almería. España. Pp. 292

Alarcón, F.J., Martínez-Díaz, M.I. 1998. Fisiología de la digestión en larvas de peces marinos y sus aplicaciones al cultivo larvario en masa. AQUANIC 5, 1-14.

Allen G.R., Robertson D.R. (1994). Fishes of the Tropical Eastern Pacific. University of Hawaii Press, Honolulu, USA 332 pp.

Álvarez-González, C.A., Cervantes-Trujano, M., Tovar-Ramírez, D., Conklin, D.E., Nolasco, H., Gisbert, E., Piedrahita, R., 2006. Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. Fish Physiology and Biochemistry 31, 83-93.

Álvarez-González, C. A., Moyano-López, F.J., Civera-Cerecedo, R., Carrasco-Chávez, V., Ortiz-Galindo, J.L., Dumas, S., 2008. Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax*

*maculatofasciatus*. I: Biochemical analysis. Fish Physiology and Biochemistry 34, 373-384.

Álvarez-González, C. A., Moyano-López, F.J., Civera-Cerecedo, R., Carrasco-Chávez, V., Ortiz-Galindo, J.L., Nolasco-Soria, H., Tovar-Ramírez, D., Dumas, S., 2010. Development of digestive enzyme activity in larvae of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus*. II: Electrophoretic analysis. Fish Physiology and Biochemistry 36, 29-37.

Anuario Estadístico de Pesca. (2010). Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca.

pp.14-15. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/integra/Pesquero/AnPes2010.pdf>

Anderson, T.A. 1991. Mechanism of digestion in the marine herbivore, the luderick, *Girella tricuspidata*. Journal of Fish Biology 39: 535-547.

Aoki, M., Kaneko, T., Katoh, F., Hasegawa, S., Tsutsui, N. and Aida, K., 2003. Intestinal water absorption through aquaporin 1 expressed in the apical membrane of mucosal epithelial cells in seawater-adapted *Japanese eel*. The Journal of Experimental Biology. 206, 3495-3505.

Appel, W., 1974. Leucine aminopeptidase determination with L-leucinamide as substrate. In: Bergmeyer H.U., (Editor), Methods of enzymatic analysis. Academic Press, New York, New York, USA, pp. 954-958.

- Applebaum, S.L., Perez, R., Lazo, J.P., Holt, G.J., 2001. Characterization of chymotrypsin activity during early ontogeny of larval red drum *Sciaenops ocellatus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 25, 291-300.
- Avilés-Quevedo, A., 2000. Cultivo de peces marinos. In: Alvarez-Torres P, Torres-Rodríguez, L.M. (eds). *Estado de salud de la acuicultura*, pp. 1-16. DGIAINP, SEMARNAT, México.
- Avilés-Quevedo, A., 2005. Calidad de huevos y larvas según el manejo de los reproductores de la cabrilla *Paralabrax maculatofasciatus*. Tesis de doctorado. Departamento de Biología Animal, Universidad de Barcelona España. 199 pp.
- Baglole, C.J., Murray, H.M., Goff, G.P., Wright, G.M., 1998. Ontogeny of the digestive tract during larval development of yellowtail flounder: a light microscopic and mucous histochemical study. *Journal of Fish Biology* 51, 120–134.
- Baragi, V., Lovell, R.T., 1986. Digestive enzyme activities in striped bass from first feeding through larval development. *Transactions of the American Fisheries Society* 115, 478-484.
- Berdegúe, A.J., 1955. La pesquería de la totoaba (*Cynoscion macdonaldi*), en San Felipe, Baja California. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* 16(1-4), 45-78.
- Bisbal, G.A., Bengtson, D.A., 1995. Development of the digestive tract in larval summer flounder. *Journal of Fish Biology* 47, 277–291.

- Bishop, C., Odense, P.H., 1966. Morphology of the digestive tract of the cod *Gadus morhua*. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 23, 1607-1603.
- Blaxter, J.H.S., 1988. Pattern and variety in development. In: Hoar, W.S. y Randall, D.J. (Eds) Fish Physiology, Vol XI A. Academic Press, San Diego. p. 1- 58.
- Boge, G., Peres, G., 1983. Adquisición reciente concerniente a la absorción intestinal de proteínas en los peces. Ichthyophysiological Acta 7, 114-118.
- Boyer, P. D., 1971. The enzymes, 3rd ed. Academic Press, Inc., New York, N.Y. pp. 369-396.
- Boza-Abarca, J.C., Calvo-Vargas, N., Solís-Ortiz, Komen, J., 2008. Desove inducido y crecimiento del pargo manchado *Lutjanus guttatus*, en la Estación de Biología Marina de Puntarenas, Costa Rica. Ciencias Marinas 34(2), 239-252.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248-254.
- Bullock, W.L., 1967. The intestinal histology of the mosquito fish *Gambusia affinis*. Acta Zoologica 48, 23-44.
- Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., 1995. Effect of the molecular form of dietary nitrogen supply in sea bass larvae: Response of pancreatic enzymes and intestinal peptidases. Fish Physiology and Biochemistry 14: 209-214.

Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., 1997. Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for compound diet feeding?. *Aquaculture International* 5, 151-160.

Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., Quazuguel, P., Le Gall, M.M., 1999. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10 day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture*, 171, 109-119.

Cahu, C., Rønnestad, I., Grangier, V., Zambonino-Infante, J.L., 2004. Expression and activities of pancreatic enzymes in developing sea bass larvae *Dicentrarchus labrax* in relation to intact and hydrolyzed dietary protein; involvement of cholecystinin. *Aquaculture* 238, 295-308.

CalCOFI. 2002. Review of some California fisheries for (2001): market squid, sea urchin, dungenes crab, lobster, prawn, abalone, groundfish, swordfish, and shark, coastal pelagic finfish, ocean salmon, nearshore live-fish, pacific herring, white seabass, and kelp. *Fisheries review, CalCOFI Rep., Vol. 43.* pp. 13-30.

CalCOFI. 2006. Review of some California fisheries for (2005): coastal pelagic finfish, market squid, dungeness crab, sea urchin, abalone, Kellet's whelk, groundfish, highly migratory species, ocean salmon, nearshore live-fish, pacific herring, and white seabass. *Fisheries review, CalCOFI Rep., Vol. 47.* pp. 27-29.

Cannon R. 1966. The Sea of Cortés. Lane Magazine and Book Co., Menlo Park, Calif.

Cara, J.B., Moyano, F.J., Cardenas, S., Fernandez-Diaz, C., Yufera, M., 2003. Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. *Journal of Fish Biology* 63, 48-58.

CDF&G (2002a). Final Statement of reason for regulatory action. <http://www.dfg.ca.gov/mrd/gillnet/finalstatement.pdf>.

CDF&G (2002b). White Seabass Fishery Management Plan, California Department of Fish & Game. <http://www.dfg.ca.gov/mrd/wsfmp/entire.html>.

Chen, B.N., Qin, J.G., Kumar, M.S., Hutchinson, W.G. y Clarke, S.M., 2006. Ontogenetic development of digestive enzymes in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture* 260, 264-271.

Chong, A.S.C., R. Hashim and A.B. Ali. 2002. Assessment of dry matter and protein digestibilities of selected raw ingredients by discus fish *Symphysodon aequifasciata* using *in vivo* and *in vitro* methods. *Aquaculture Nutrition* 8, 229-238.

Cisneros-Mata, M., Botsford, L.W., Quinn, J.F., 1997. Projecting of *Totoaba macdonaldi*, a population with unknown age-dependent variability. *Ecol. Appl* 7, 968–980.

Cisneros-Mata M.A., G. Montemayor-López y M.J. Román-Rodríguez. 1995. Life history and conservation of *Totoaba macdonaldi*. Conservation Biology. 9(4): 806-814.

CITES. 2005. Appendices I, II and III (12/01/2005). Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, Geneva, Switzerland, 49 pp.

Civera-Cerecedo, R., Ortiz-Galindo, J.L., Dumas, S., Nolasco-Soria., Alvarez-González, C.A., Anguas-Vélez, B., Peña-Martínez, R., Rosales-Velazquez, M.O., Carrasco-Chávez, R., García-Gómez, R., Goytortúa-Bores, E., 2002. Avances en la nutrición de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. pp. 352-408. En: Cruz-Suárez, L.E., Rique-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M.G., Simoes, N. (Eds). VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, 3 al 6 de Septiembre de 2002, Cancún, Quintana Roo, México.

Cousin, J.C.B., Baudin-Laurencin, F., Gabaudan, J., 1987. Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting turbot, *Scophthalmus maximus* L. Journal of Fish Biology 30, 15-33.

Dabrowski, K., 1982. Proteolytic enzyme activity decline in starving fish alevins and larvae. Environmental Biology of Fishes 7, 73-76.

Dabrowsky, K. The feeding of the fish larvae: Present «estate of the art» and perspectives. Reproduction Nutrition Development 24 (6), 807-833.

- Darias, M.J., Murray, H.M. Martínez-Rodríguez, G., Cárdenas, S. y Yúfera, M., 2005. Gene expression of pepsinogen during the larval development of red porgy *Pagrus pagrus*. *Aquaculture* 248, 245-252.
- De La Noue, J., Chobert, G., Pouliot, T., 1980. Digestibility in the rainbow trout as affected by the number of pyloric caeca. Dry matter, amino acid, carbohydrate and energy, en *Aquaculture - A Biotechnology in Progress*, vol. 2 (Eds N. de Pauw, E. Jaspers, H. Ackefors y N. Wilkins) European Aquaculture Society, Belgium, pp. 829-837.
- Díaz-López, M., Moyano-López, F.J., García-Carreño, L.F., Alarcon, F.J., Sarasquete, M.C. 1997. Substrate-SDS-PAGE determination of protease activity through larval development in sea bream. *Aquaculture International* 5, 461-471.
- Dimes, L.E. y Haard, N.F., 1994. Estimation of protein digestibility – I. Development of an *in vitro* method for estimating protein digestibility in salmonids (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 108 A, 349-362.
- Dotson, R.C. y Charter, R.L., 2003. Trends in the Southern California sport fishery. *CalCOFI Rep.*, Vol. 44, pp. 94-106.
- Douglas, S.E., Gawlicka, A., Mandlam, S., Gallant, J.W., 1999. Ontogeny of the stomach in winter flounder: characterization and expression of the pepsinogen and proton pump genes and determination of pepsin activity. *Journal of Fish Biology*. 55, 897-915.

- Dumermuth, E., Bond, J., Flannery, A., y Beynon, R. 1991. The astacin family of metalloendopeptidases. *Journal of Biological Chemistry* 266, 21831-21835.
- Duncan, N., Rodríguez, G., Alock, D., y Zohar, Y. 2003. Effects of controlled delivery and acute injections of LHRH-a on bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus* spawning. *Aquaculture* 218, 625-635.
- Durazo, E., Cruz, A.C., López, L.M., Lazo, J.P., Drawbridge, M., Viana, M.T., 2010. Effects of digestible protein levels in isonitrogenous diets on growth performance and tissue composition of juvenile *Atractoscion nobilis*. *Aquaculture Nutrition* 16, 54-60.
- Dutton, P. 1992. Effects of experience on feeding success by larval white seabass, *Atractoscion nobilis*. *Journal of Fish Biology* 41, 765-73.
- Elbal, M.T., García-Hernández, M.P., Lozano, M.T., Aguelleiro, B., 2004. Development of the digestive tract of gilthead sea bream *Sparus aurata* L. Light and electron microscopic studies. *Aquaculture* 234, 215-238.
- Erlanger, B., Kokowsky, N., Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95, 271-278.
- Falk-Petersen, I.B., Hansen, T.K., 2001. Organ differentiation in newly hatched common wolffish. *Journal of Fish Biology* 59, 1465-1482.
- Falk-Petersen, I.B., 2005. Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish. *Fish Shellfish Immunology* 19, 397– 412.

- Flanagan, C. A., Hendrickson, J.R., 1976. Observations on the comercial fishery and reproductive biology of the Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) Gilbert 1890 in the northern Gulf of California. Fishery Bulletin 74(3), 531-544.
- Fange, R., Grove, D. 1979. Digestion. In: *Fish Physiology*, Vol III (W.S. Hoar, D.J. Randall y J.R. Brett), Academic Press, NY, pp. 161-260.
- FAO 2010. Estado mundial de la pesca y acuicultura. FAO, Roma, 242pp. ISBN 978-92-5-306675-9.
- Galaviz, M.A., García-Gasca, A., Drawbridge, M., Álvarez-González, C.A., López, L.M., 2011. Ontogeny of the digestive tract and enzymatic activity in White sea bass *Atractoscion nobilis* larvae. *Aquaculture* 318, 162-168.
- Galaviz, M.A., García-Ortega, A., Gisbert, E., López, L.M., García-Gasca, A. (En revision). Expression and activity of two digestive proteases (trypsin and pepsin) during larval development of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* (Aceptada).
- Gauger, B., Drawbridge, M., Kaufmann, R., Jirsa, D., 2007. Egg and larval quality of captive white seabass *Atractoscion nobilis*. Abstract *Aquaculture 2007*, February 26 - March 2, San Antonio, Texas, USA World Aquaculture Society.
- García-Gasca, A., Galaviz, M., Gutiérrez, J.N., García-Ortega, A., 2006. Developement of the digestive tract, trypsin activity and gene expression in eggs and larvae of the bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*. *Aquaculture* 256, 366-376.

García Ortega, A. 2000. Valor nutricional de los quistes de *Artemia* y su uso como fuente de proteína en dietas artificiales para larvas de peces. In: Cruz – Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A & Civera- Cerecedo, R., (Eds). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán. p. 287-299.

García-Ortega, A., Hernández, C., Abdo-de la Parra, I., & González-Rodríguez., B 2002. Advances in the nutrition and feeding of the bullseye puffer *Sphoeroides annulatus*. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola- Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de septiembre del 2002. Cancún Quintana Roo, México. p. 187-196.

García-Ortega, A., Abdo, I., Duncan, N., Rodríguez, E., Velasco, G., González, B., Puello, A. and Martínez, I., 2005. Larval rearing of spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* under experimental conditions. In: C.I. Hendry, G. Van Stappen, M. Wille and P. Sorgeloos (Eds.) Larvi '05- Fish and Shellfish Larviculture Symposium. European Aquaculture Society, Special Publication No. 36, Oostende, Belgium. pp. 172-175.

- 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.
- Gawlicka, A., Leggiadro, C.T., Gallant, J.W. y Douglas, S.E. 2001. Cellular expression of the pepsinogen and gastric proton pump genes in the stomach of winter flounder as determined by in situ hybridization. *Journal of Fish Biology* 58, 529-536.
- Giffard-Mena, I., Charmantier, G., Grousset, E., Aujoulat, F., Castille, R., 2006. Digestive tract ontogeny of *Dicentrarchus labrax*: Implication in osmoregulation. *Development, Growth and Differentiation* 48, 139-151.
- Gisbert, E., Piedrahita, R.H., Conklin, D.E., 2004. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut *Paralichthys californicus* with notes on feeding practices. *Aquaculture* 232, 455-470.
- Gisbert, E., Ortiz-Delgado, J.B., Sarasquete, C., 2008. Nutritional cellular biomarkers in early life stages of fish. *Histology and Histopathology* 23, 1525-1539
- Govoni, J.J., 1980. Morphological, histological, and functional aspects of alimentary canal and associated organ development in larval *Leiostomus xanthurus*. *Review of Canadian Biology* 39, 69–80.

Govoni, J.J., Boenlert, G.W., Watanabe, Y., 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environmental Biology of Fishes* 16, 59–77.

Guillaume, J., Métailler, R., Kaushik, S., 2001. *Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans*. Praxis Publishing Ltd. Chichester, UK .pp241-301.

Hajjou, M., Smine, A., Guerard, F., Legal, Y., 1995. Purification and some properties of a carboxypeptidase B from dogfish *Scyliorhinus canicula*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 110B (4): 791-798.

Hamlin, H., Hunt Von Herbing, I., Kling, L., 2000. Histological and morphological evaluations of the digestive tract and associated organs of haddock throughout post-hatching ontogeny. *Journal of Fish Biology* 57, 716-732.

Hayashi, R. 1976. Carboxypeptidase Y. *Meth. Enzym.*, 45: 568-586.

Hepher Balfour (1988). *Nutrición de peces comerciales en estanques*. Limusa. México D.F. p.15.

Hickling, C.F., 1966. On the feeding process in the white amur, *Ctenopharyngodon idella*. *Journal of Zoology* 148: 404-418.

Hjelmeland, K., Jørgensen, T., 1985. Evaluation of radioimmunoassay as a method to quantify trypsin and trypsinogen in fish. *Transactions of the American Fisheries Society* 114, 619– 621.

Holt, G.J. 1993. Feeding larval red drum on microparticulate diets in a closed recirculating water system. *Journal of World Aquaculture Society* 24, 225-230.

Humanson, G. 1979. Animal tissue techniques. 4th edition. W.H. Freeman and Co., San Francisco, CA.

Hummel, B.C.W., 1959. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology 37, 1393-1399.

Ibarra-Castro. L., Duncan, N., 2007. GnRHa-induced spawning of wild-caught spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. Aquaculture 272, 737-746.

Ibarra-Castro, L., Álvarez-Lajonchère, L., 2009. Improved induced-spawning protocol for the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. The Israeli Journal of Aquaculture- Bamidgeh 61, 121-13.

Izquierdo, M.S., Socorro, J., Arantzamendi, L., Hernández-Cruz, C.M., 2000. Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. Fish Physiology and Biochemistry 22, 97-107.

Jirsa, D., Stuart, K., Drawbridge, M., 2007. The effects of tank color and light intensity on growth, survival and stress tolerance of larval white seabass *Atractoscion nobilis*. Journal of the World Aquaculture Society 40, 702-709.

Jónás, E., Rágyanski, M., Oláh, J., Boross, L., 1983. Proteolytic digestive enzymes of carnivorous *Silurus glanis*, herbivorous *Hypophthalmichthys molitryx*, Val. and omnivorous *Cyprinus carpio* fishes. Aquaculture 30, 145-154.

- Kapoor, B.G., Smith, H., Verighina, I.A., 1975. The alimentary canal and digestion in fish. In: *Advances in Marine Biology*, vol 13 (C.M. Young y F.S. Russell), Academic Press, NY, pp. 109-213.
- Kawai, S., Ikeda, S., 1973. Studies on digestive enzymes of fishes. Part 4. Development of the digestive enzymes of carp and black sea bream after hatching. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish* 39, 877-881.
- Kent, D. B., Ford, R. F., Drawbridge, M. A., 2001. Experimental culture and evaluation of enhancing marine fishes in Southern California. The California Department of Fish and Game and The Ocean Resources Enhancement and Hatchery Program Advisory Panel. Hubbs-Sea World Research Institute/San Diego State University. San Diego, CA, 66 pp.
- Kjorsvik E, A Mangor-Jensen & I Holmefjord. 1990. Eggs quality in fish. *Advance in Marine Biology* 26, 71-11.
- Kjorsvik, E., Van der Meeren, T., Kryvi, H., Arnfinnson, J., Kvenseth, P.G., 1991. Early development of the digestive tract of cod larvae, *Gadus morhua* L., during start-feeding and starvation. *Journal of Fish Biology* 38, 1-15.
- Kolkovski, S., Dabrowski, D., 1999. Diets for fish larvae present state of art. *World Aquacult. Symp. Sydney Australia. World Aquaculture Society., Australia*, p. 406.
- Kolkovski, S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* 200, 181-201.

- Kolkovski, S. y Sakakura Y. 2007. Yellowtail kingfish culture-Opportunities and problems. *World Aquaculture* 38, 44-48.
- Krementz, A.B., Chapman, G.B., 1975. Ultraestructure of the posterior half of the intestine of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of Morphology* 145, 441-482.
- Kurokawa, T., Suzuki, T., 1996. Formation of the diffuse pancreas and the development of digestive enzyme synthesis in larvae of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 141, 267-276.
- Kurokawa, T., Shiraishi, M., Suzuki, T., 1998. Quantification of exogenous protease derived from zooplankton in the intestine of Japanese sardine *Sardinops melanotictus* larvae. *Aquaculture* 161,491-499.
- Kurokawa, T., Suzuki, T., Ohta, H., Kagawa, H., Tanaka, H., Unuma, H., 2002. Expression of pancreatic enzyme genes during the early larval stage of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Science* 68, 736-744.
- Lauff. M., Hoffer, R., 1984. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture* 37, 335-346.
- Lazo, J.P., Holt, G.J., Arnold, C.R., 2000b. Ontogeny of pancreatic enzymes in larval red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture Nutrition* 6, 183-192.
- Lee, G., Litvak, M., 1996. Weaning of metamorphosed winter flounder *Pleuronectes americanus* reared in the laboratory: comparison of two commercial artificial diets on growth, survival and conversion efficiency. *Aquaculture* 144, 251–263.

- Lee, J.J., Chen, H.C., Jiang, S.T., 1993. Purification and characterization of proteinases identified as cathepsins L and L-like (58 kDa) proteinase from mackerel (*Scomber australasicus*). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 57(9), 1470–1476.
- Lehninger, A.L. 1984. *Bioquímica*. 2ª ed. Omega. Barcelona, España 1198 pp.
- López, L.M., Torres, A.L., Durazo, E., Drawbridge, M., Bureau, D., 2006. Effects of lipid on growth and feed utilization of white seabass *Atractoscion nobilis* fingerlings. *Aquaculture* 253, 557-563.
- López, L.M., Durazo, E., Rodríguez, M.A., True, C., Viana, M.T., 2006. Proximate composition and fatty acids profile of wild and cultured juveniles *Totoaba macdonaldi*. *Ciencias Marinas*. 32(2), 303-309.
- López, L.M., Durazo, E., Viana, M.T., Drawbridge, M., Bureau, D., 2009. Dietary lipid levels effect on performance, body composition and fatty acid profile of juvenile white seabass, *Atractoscion nobilis*. *Aquaculture* 289,101-105.
- Micale, V.M., Garrafo, L., Genovese, M., Spedicato, M.T., Muglia, U., 2006. The ontogeny of the alimentary tract during larval development in common pandora *Pagellus erythrinus* L. *Aquaculture* 251, 354-365.
- Micale, V., Di Giancamillo, A., Domeneghini, C., Mylonas, C.C., Nomikos, N., Papadakis, I.E., Muglia, U., 2008. Ontogeny of the digestive tract in sharpsnout sea bream *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777). *Histology and Histopathology* 23, 1077-1091.

- Mohsin, S.N. 1962. Comparative morphology and histology of the alimentary canals in certain groups of indian teleost. *Acta Zoologica* 43, 79-133.
- Morales-Ortíz C. 1999. Descripción del desarrollo embrionario de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) bajo condiciones de laboratorio. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B.C., México, 56 pp.
- Moser, H. G., Ambrose, D. A., Busby, M. S., Butler, J. L., Sandknop, E. M., Sumida, B. Y., Stevens, E. G. 1983. "Description of early stages of white seabass, *Atractosion nobilis*, with notes on distribution." California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Report 24, 182-193.
- Moyano, F.J., Díaz, M., Alarcón, F.J., Sarasquete, M.C., 1996. Characterization of digestive enzyme activity during development of gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Fish Physiology and Biochemistry* 15, 121-130.
- Murray, H.M., Perez-Casanova, J.C., Gallant, J.W., Johnson, S.C., Douglas, S.E., 2004. Trypsinogen expression during the development of the exocrine pancreas in Winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part S* 138, 53-59.
- Murray, H.M., Gallant, J.W., Johnson, S.C., Douglas, S.E., 2006. Cloning and expression analysis of three digestive enzymes from Atlantic halibut *Hippoglossus Hippoglossus* during early development: Predicting gastrointestinal functionality. *Aquaculture* 252, 394-408.

- O'Connell, C.P. 1976. Histological criteria for diagnosing the starving condition in early post yolk sac larvae of the northern anchovy, *Engraulis mordax* Girard. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 25, 285-312.
- Oozeki, Y., Bailey, K.M., 1995. Ontogenetic development of digestive enzyme activities in larval walleye pollock, *Theragra chalcogramma*. *Marine Biology* 122,177–186.
- Ortiz-Delgado, J.B., Darias, M.J., Cañavate, J.P., Yufera, M., Sarasquete, C., 2003. Organogenesis of the digestive tract in the White seabream, *Diplodus sargus*. Histological and Histochemical approaches. *Histology and Histopathology* 18, 1141-1154.
- Pedersen, B.H., 1993. Protein digestion in herring *Clupea harengus* larvae: Trypsinogen secretion, and effects of a transitory food restriction on mortality, growth and digestive enzyme concentration. *In: Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development*. Edited by B.T. Walther and H.J. Fhyn. University of Bergen, Norway.
- Peña, R., Dumas, S., Villalejo-Fuerte, M., Ortiz-Galindo, J., 2003. Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. *Aquaculture* 219, 633- 644.
- Péres, A., Zambonino Infante, J.L., Cahu, C., 1998. Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Fish Physiology and Biochemistry* 19, 145–152.

- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Gatge, M.S., Deshpade, V.V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62. pp. 594-635.
- Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L., Dinis, M.T., 1999. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture* 170, 465-473.
- Rungruangsak-Torrissen, K., Moss, R., Andresen, L.H., Berg, A., Waagbø, R., 2006. Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Fish physiology and Biochemistry* 32, 7-23.
- Sandoval-Garibaldi G. 2001. Desarrollo morfológico de la totoaba (*Totoaba macdonaldi*) (Gilbert, 1890) durante su estadio larval en condiciones de laboratorio. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B.C., México. 75 p.
- Sarasquete, M. C., Polo, A., Gonzalez de Canales, M. L., 1993. A histochemical and immunohistochemical study of digestive enzymes and hormones during the larval development of *Sparus aurata* L. *Histochemical Journal* 24, 337-344.
- Sarasquete, M.C., Polo, A., Yufera, M., 1995. Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead sea bream *Sparus aurata* L. *Aquaculture* 130, 79-82.

- Sarath, G., De la Monte, R.S., Warner, F.W., 1989. Protease assay methods. Pages 25–56. In: R.J. Beyon and J.S. Bond, editors. *Proteolytic enzymes: a practical approach*. Oxford University Press, New York, New York, USA.
- Segner, H., Rosch, V., Schmidt, H., & von Poeppinghausen, K. J., 1989. Digestive enzymes in larval *Coregonus laveratus*. *Journal of Fish Biology* 35, 249-263.
- Segner, H., Storch, V., Reinecke, M., Kloas, W., Hanke, W., 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot *Scophthalmus maximus*. *Marine Biology* 119, 471-486.
- Squires, J., Haard, N.F., Feltham, L.A.W., 1986. Pepsin isozymes from Greenland cod (*Gadus ogac*). 2. Substrate specificity and kinetic properties. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology* 65, 215-222.
- Smith, L., 1989. Digestive Functions in Teleost Fishes *In Fish Nutrition*. J. Halver (Ed.) Academic Press, Inc. London. Pp 332-422.
- Srivastava, A., Kurokawa, T., Suzuki, T., 2002. mRNA expression of pancreatic enzyme precursors and estimation of protein digestibility in first feeding larvae of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 132, 629-635.
- Steffens, W. 1989 *Principles of Fish Nutrition*, Ellis Horwood, London. 384pp
- Solórzano Y. 2006. Efecto de niveles de alimentación sobre el crecimiento y composición química de juveniles de *Totoaba macdonaldi*. Tesis de

Maestría Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de ciencias marinas.

Suzer, C., Kamacı, H.O., Çoban, D., Saka, Ş., Fırat, K., Ozkara, B., Ozkara, A., 2007. Digestive enzyme activity of the red porgy *Pagrus pagrus*, L. during larval development under culture conditions. *Aquaculture Research* 38, 1178-1785.

Tanaka, M., 1972. Studies on the structure and function of the digestive system in teleost larvae. Part 5: Epithelial changes in the posterior gut and protein digestion. *Japanese Journal of Ichthyology* 19, 172-180.

Tengjaroenkul, B., Smith, B.J., Smith, S.S., Chatreewongsin, U. 2002. Ontogenic development of intestinal enzymes of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture* 211, 241-251.

Thomas, J. C. 1968. "Management of the white seabass (*Cynoscion nobilis*) in California waters." *California Dep. Fish and Game, Fish Bulletin* 142, 1-34.

True C.D., N. Castro-Castro, G. Sandoval-Garibaldi y C. Morales-Ortiz. 2001. Reproducción Controlada de *Totoaba macdonaldi* (Gilbert). Resumen de ponencia oral del VII Congreso de la Asociación de Investigadores del Mar de Cortés. Pag. 82.

True C.D., A. Silva Loera y N. Castro Castro. 1997. Acquisition of *Totoaba macdonaldi* (*Sciaenidae*) broodstock: field handling, decompression and prophylaxis of an endangered species. *Progressive Fish-Culturist*. 59(3).

Ueberschär, B., 1993. Measurement of proteolytic enzyme activity: Significance and application in larval fish research. Part III 233-239 *In: Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development*. Edited by B.T. Walther and H.J. Fhyn. University of Bergen, Norway.

Valverde-Chavarría, S. 2002. Desarrollo del sistema digestivo de larvas de corvina blanca, *Atractoscion nobilis* (Ayres, 1860) (Sciaenidae), y selección de fuentes proteicas adecuadas para su alimentación. Tesis de maestría. Centro de investigación científica y educación superior de Ensenada.

Vegas-Velez, M. 1972. La structure histologique du tube digestif des poissons Téléostéens. *Tethys* 4: 163-174.

Vega-Villasante, F., Nolasco-Soria, H., Civera-Cerecedo, R., 1993. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis* I. Properties of amylase activity on digestive tract. *Comparative Biochemistry and Physiology* 112, 123-129.

Verreth, J., Torreale, E., Spazier, E., Van der Sluiszan, A., Rombout, J., Booms, R., and Segner, H., 1992. The development of functional digestive system in the African catfish *Clarias* (Burchell). *Journal of the World Aquaculture Society* 23, 286-298.

Vizcaíno E. 2008. Efecto en el crecimiento, consumo, sobrevivencia y composición proximal de juveniles de *Totoaba macdonaldi*, alimentados con dietas

- isprotéicas formuladas con distintos niveles de energía. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de ciencias marinas.
- Vojkovich, M., Reed, J.R., 1983. White seabass, *Atractoscion nobilis*, in California-Mexican waters: Status of Fishery. CalCOFI Report 24, 79-83.
- Vu, T.T., 1983. Etude histoenzymologique des activités proteasiques dans le tube digestif des larves et des adultes de bar, *Dicentrarchus labrax* (L). Aquaculture 32, 57-69.
- Walford, J., Lam, T.J., 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass *Lates calcarifer* larvae and juveniles. Aquaculture 109, 187–205.
- Watanabe, Y. 1984. An ultrastructural study of intracellular digestion of horseradish peroxidase by the rectal epithelium cells in larvae of a freshwater cottid fish *Cottus nowawae*. Bulletin of the Japanes Society For the Science of Fish 50, 409-416.
- Watanabe, T., Tamiya, T., Oka, A. , Hirata, C., Kitajima, C. S., Fujita, 1984. Improvement of dietary value of live foods for fish larvae by feeding them on w3 highly unsaturated fatty acids and fat-soluble vitamins. 50, 1015-1022.
- Whitaker, J.R. 1994. Principles of Enzymology for the Food Sciences. 2nd ed., Marcel Dekker, INC, New York.
- Yufera, M., Fernández - Díaz, C., Vidaurreta A., Cara, J.B., Moyano, F.J., 2004. Gastrointestinal pH and development of the acid digestion in larvae and

early juveniles of *Sparus aurata* L. Pisces: teleostei. Marine Biology, 144, 863-869.

Yúfera, M., Darias, M.J., 2007. Changes in the gastrointestinal pH from larvae to adult in Senegal sole *Solea senegalensis*. Aquaculture 267, 94-99.

Zacarías-Soto, M., Muguet, J.B., Lazo, J.P., 2006. Proteolytic activity in California Halibut Larvae *Paralichthys californicus*. Journal of World Aquaculture Society 37 (2), 175-185.

Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C., 1994. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in seabass *Dicentrarchus labrax* larvae. Fish Physiology and Biochemistry 12, 399-408.

Zambonino-Infante, J.J., Cahu, C., Péres, A., Quazuguel, P., Le Gall, M.M., 1996. Sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae fed different Artemia rations: growth, páncreas enzymatic response and development of digestive functions. Aquaculture 139, 129-139.

Zambonino-Infante, J.J., Cahu, C., Péres, A., 1997. Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. The Journal of Nutrition 127, 608-614.

Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L., 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. Comparative Biochemistry and Physiology C 130, 477-487.

Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L., 2007. Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish: Applications to diet formulation. *Aquaculture* 268, 98-105.

Zambonino-Infante, J., Gisbert, E., Sarasquete, C., Navarro, I., Gutierrez, J., Cahu, C. L., 2008: Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In: *Feeding and digestive functions of fish*. J. E. O. Cyrino, D. Bureau and B. G. Kapoor (Eds). Science Publishers Inc., Enfield, pp. 277–344.

#### **5,4, ANEXOS**

##### **PRODUCTOS:**

**Hasta el momento se han obtenido los siguientes productos del presente estudio.**



## Ontogeny of the digestive tract and enzymatic activity in white seabass, *Atractoscion nobilis*, larvae

Mario A. Galaviz<sup>a</sup>, Alejandra García-Gasca<sup>b</sup>, Mark Drawbridge<sup>c</sup>, Carlos Alfonso Álvarez-González<sup>d</sup>, Lus M. López<sup>a,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Maestría y Doctorado en Oceanografía Costera, Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California (UABC), PO Box 76, Ensenada B.C., 22860, México

<sup>b</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Mazatlán (CIAD), PO Box 711, Mazatlán, Sinaloa, C.P. 82000, México

<sup>c</sup> Hubbs-SeaWorld Research Institute, 2395 Ingraham St., San Diego, CA 92109, USA

<sup>d</sup> Laboratorio de Acuicultura Tropical DACBOL-UPAT, Carr. Vialá-Cárdenas Km 0.5, Baques de Salaya, Villahermosa, Tabasco, México

<sup>e</sup> Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California (UABC), PO Box 76, Ensenada B.C. 22860, México

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 May 2010

Received in revised form 18 April 2011

Accepted 5 May 2011

Available online 14 May 2011

#### Keywords:

Larvae

Ontogeny

Histology

Digestive system

Digestive enzymes

White seabass

### ABSTRACT

The development of the digestive system and digestive enzyme activity in white seabass larvae, *Atractoscion nobilis*, were analyzed from hatching until 40 days post hatch (dph) using histological and biochemical approaches. The development of the digestive system in *A. nobilis* larvae was similar to that reported for other marine fish species. Larvae at 3 dph ( $0.55 \pm 0.001$  mg wet weight and  $3.6 \pm 0.02$  mm total length), cultured at 18 °C in seawater, presented all the structures (i.e. differentiation of the alimentary canal into the buccopharynx, esophagus, anterior and posterior intestines, pancreas with zymogen granules, liver, gall bladder and open mouth) necessary for the digestion and absorption of nutrients such as proteins and lipids (primarily). At this time, the larvae had fully-developed digestive systems that allowed them to digest inert feed and to absorb nutrients throughout the intestine walls. On the other hand, most digestive enzyme activities were detected at the moment of hatching. Trypsin activity was  $0.80 \pm 0.16$  mU/mg protein at 1 dph ( $0.51 \pm 0.001$  mg wet weight larvae), and increased gradually during the following days, but most notably after the initial exogenous feeding at 4 dph. The specific activity of chymotrypsin was  $7.21 \pm 1.29$  mU  $\times 10^{-4}$ /mg protein at 1 dph and reached peak level ( $15.9 \pm 1.02$  mU  $\times 10^{-4}$ /mg protein) at 18 dph ( $6.6 \pm 0.003$  mg wet weight larvae). The specific activity of leucine aminopeptidase increased continuously from  $1.31 \pm 0.05$  mU  $\times 10^{-3}$ /mg protein at 1 dph to  $15.91 \pm 0.40$  mU  $\times 10^{-3}$ /mg protein at 18 dph. The activity of  $\alpha$ -amylase at 1 dph was  $1.35 \pm 0.09$  U/mg protein, increasing to  $8.07 \pm 0.98$  U/mg protein at 16 dph. The activity of pepsin was detected at a very low level ( $0.71 \pm 0.53$  U/mg protein) at 10 dph, and a stepwise increase in activity was observed between 16 and 20 dph, reaching maximum level ( $13.92 \pm 0.09$  U/mg protein) at 40 dph. These results indicate that the digestive tract develops rapidly in this species and that the stomach becomes functional between 16 and 18 dph. It should, therefore, be possible to start weaning the fish at this young age.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

In southern California and Baja California, the white seabass *Atractoscion nobilis* supports an important commercial and sport fishery (Vojtkovich and Reed, 1983). Its wide acceptance and high market value led to over-harvesting the wild stocks in many areas (Drawbridge and Kent, 1997), which in turn led to the development of a comprehensive stock replenishment program that was initiated in southern California in 1983 (Kent et al., 1995). As the production capacity of *A. nobilis* has increased, so too has the interest in applying the technology to commercial farming (Drawbridge and Kent, 2001). Research related to the nutritional requirements of this species is

limited; our research group has reported on macronutrient selection and the effects of digestible protein, lipid, and carbohydrate requirements on juveniles and young adults (Durazo et al., 2010; Jirsa et al., 2010; López et al., 2006; 2009).

In typical aquaculture operations, weaning is extended 1 or 2 weeks after the digestive tract is fully developed in order to reduce body malformation and mortality, or performed as early as possible to reduce the cost of live food production. For this reason, knowledge of early ontogeny of the digestive tract and digestive enzyme activity in fish larvae is of value for establishing appropriate feeding and weaning routines for target aquaculture species (Baglote et al., 1997; Zambonino-Infante and Cahu, 2001), as in the case of gilthead sea bream *Sparus aurata* (Sarasquete et al., 1995), red drum *Sciaenops ocellatus* (Lazo et al., 2000), California halibut *Paralichthys californicus* (Álvarez-González et al., 2006; Gisbert et al., 2004), yellow croaker *Pseudosciaena crocea* (Ma et al., 2005; Mai et al., 2005), bullseye puffer

\* Corresponding author at: UABC, PO Box 76, Ensenada BC 22860, México. Tel.: +52 646 1744570x147; fax: +52 646 1744108.

E-mail address: llopez@uabc.edu.mx (L.M. López).

**Sometido a Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 2011.**

1 **Expression and activity of two digestive proteases (trypsin and pepsin)**  
2 **during larval development of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*.**

3

4 Mario A. Galaviz<sup>a</sup>, Armando García-Ortega<sup>b,+</sup>, Enric Gisbert<sup>c</sup>, Lus M. López<sup>a</sup>

5 Alejandra García Gasca<sup>b\*</sup>

6

7 <sup>a</sup> Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California (UABC),

8 PO Box 76, Ensenada B.C. 22860, Mexico.

9 <sup>b</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Mazatlán en

10 Acuicultura y Manejo Ambiental, Avenida Sábalo Cerritos s/n, Mazatlán, Sinaloa

11 82010, Mexico.

12 <sup>c</sup> Institut de Recercai Tecnologia Agroalimentàries. IRTA Sant Carles de la Ràpita,

13 Tarragona, Spain.

14

15 \*Corresponding author:

16 Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo

17 Avenida Sábalo Cerritos s/n, Mazatlán, Sinaloa 82010, Mexico.

18 Tel. 52-669-989-8700

19 Fax 52-669-989-8701

20 E-mail address: [alegar@ciad.mx](mailto:alegar@ciad.mx)

21

22 <sup>+</sup>Present address: Pacific Aquaculture & Coastal Resources Center, University of

23 Hawaii at Hilo, USA.

**SECUENCIAS OBTENIDAS DE LA PRESENTE TESIS Y REGISTRADAS EN GENBANK.**

**Totoaba macdonaldi 18S ribosomal RNA gene, partial sequence**

**GenBank: HM754483.1**

LOCUS HM754483 463 bp DNA linear VRT 02-FEB-2011  
DEFINITION Totoaba macdonaldi 18S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
ACCESSION HM754483  
VERSION HM754483.1 GI:311102194  
KEYWORDS .  
SOURCE Totoaba macdonaldi  
ORGANISM [Totoaba macdonaldi](#)  
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;  
Euteleostomi; Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei;  
Euteleostei; Neoteleostei; Acanthomorpha; Acanthopterygii;  
Percomorpha; Perciformes; Percoidei; Sciaenidae; Totoaba.  
REFERENCE 1 (bases 1 to 463)  
AUTHORS Galaviz, M.A., Hernandez-Cornejo, R., Lopez, L.M. and Garcia-Gasca, A.  
TITLE Expression and activity of three digestive proteases during larval development of the Totoaba (Totoaba macdonaldi)  
JOURNAL Unpublished  
REFERENCE 2 (bases 1 to 463)  
AUTHORS Galaviz, M.A., Hernandez-Cornejo, R., Lopez, L.M. and Garcia-Gasca, A.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (13-JUL-2010) Molecular Biology, CIAD, Avenida Sabalo Cerritos s/n, Mazatlan, Sinaloa 82010, Mexico  
FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..463  
/organism="Totoaba macdonaldi"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/db\_xref="taxon:245095"  
/dev\_stage="larvae"  
[rRNA](#) <1..>463  
/product="18S ribosomal RNA"  
ORIGIN  
1 ataaaattcc agotgccata goggatcttg atatcgctgc agttaaaca ctcgtagttg  
61 gatctcggga togagccgtc gaacagccgc cgggccgacc accgtctgtc ccagcccctg  
121 cctctcggcg ccctacgat gctcttagct gagtgtgccc gcgcggtccga agcgtctact  
181 ttgaaaaaat tagagtgttc aaaccaggcg ccgtcgccag taaaccgcag ctacgaatat  
241 tggaatagaa ctccggttct attttgtggg ttttcttctc tgaactgggg ccatgattaa  
301 gagggagccc cgggggcatt cgtattgtgc ggctagaggt gaaattcttg acccggcaga  
361 agacggacga aagcgaaagc atttgccaag aatgttttca taattcaaga acgaaagtcg  
421 gaggttcgaa gacgatcaga tactgtcgtg gttccgatca tca

**Totoaba macdonaldi pepsinogen mRNA, partial cds**

**GenBank: HM754482.1**

```
LOCUS       HM754482 450 bp    mRNA    linear   VRT 02-FEB-2011
DEFINITION  Totoaba macdonaldi pepsinogen mRNA, partial cds.
ACCESSION   HM754482
VERSION     HM754482.1  GI:311102192
KEYWORDS    .
SOURCE      Totoaba macdonaldi
  ORGANISM  Totoaba macdonaldi
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
            Euteleostomi; Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei;
            Euteleostei; Neoteleostei; Acanthomorpha; Acanthopterygii;
            Percomorpha; Perciformes; Percoidei; Sciaenidae; Totoaba.
REFERENCE   1 (bases 1 to 450)
  AUTHORS   Galaviz,M.A., Hernandez-Cornejo,R., Lopez,L.M. and Garcia-
            Gasca,A.
  TITLE     Expression and activity of three digestive proteases during
            larval development of the Totoaba (Totoaba macdonaldi)
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2 (bases 1 to 450)
  AUTHORS   Galaviz,M.A., Hernandez-Cornejo,R., Lopez,L.M. and Garcia-
            Gasca,A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (13-JUL-2010) Molecular Biology, CIAD, Avenida
            Sabalo Cerritos s/n, Mazatlan, Sinaloa 82010, Mexico
FEATURES             Location/Qualifiers
     source             1..450
                       /organism="Totoaba macdonaldi"
                       /mol_type="mRNA"
                       /db_xref="taxon:245095"
                       /dev_stage="larvae"
     CDS                <1..>450
                       /note="pepsin; protease; digestive enzyme"
                       /codon_start=3
                       /product="pepsinogen"
                       /protein_id="ADP68629.1"
                       /db_xref="GI:311102193"

/translation="GDQPLSIQYAAGSMTGYLGS DIVEVRRISVNNQVCGFSDSEALL
HAHMHADGILGLALQSNASDDVVPVFDNMISQHLVSQTLFSVYLSSNSQQGNEVLSSG
IDSNYYTGQITWIPLTSATYWQIKMDSVTINGQTVACSDGCEAIIDN"
ORIGIN

     1 gggggcgacca gcctctgtcc atccagtaag cagctggcag catgaccgga tatctgggca
    61 gcgacattgt tgaggtgcga cgcattctct tgaacaacca ggtgtgtggt ttcagcgact
   121 cagaggctct cctacatgct cacatgcacg ctgatggtat cctgggactg gctctccagt
   181 ccaatgcctc tgacgatggt gtgccagtct ttgacaacat gatcagccag cacctggtgt
   241 cacagaccct gttctctgtc tacctgagca gcaacagtca gcagggcaat gaggtgctct
   301 ccggtggtat tgacagcaac tactacactg gacaaattac ctggatccct ctgacctctg
   361 ccacctactg gcagatcaaa atggacagtg ttaccatcaa tggacagact gtggcctgct
   421 ctgatggttg cgaggccatc atcgacaatc
```

**Totoaba macdonaldi chymotrypsin mRNA, partial cds**

GenBank: HM754481.1

```
LOCUS       HM754481 475 bp      mRNA      linear      VRT 02-FEB-2011
DEFINITION  Totoaba macdonaldi chymotrypsin mRNA, partial cds.
ACCESSION   HM754481
VERSION     HM754481.1  GI:311102190
KEYWORDS    .
SOURCE      Totoaba macdonaldi
  ORGANISM  Totoaba macdonaldi
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
            Euteleostomi; Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei;
            Euteleostei; Neoteleostei;
            Acanthomorpha; Acanthopterygii; Percomorpha; Perciformes;
            Percoidei; Sciaenidae; Totoaba.
REFERENCE   1 (bases 1 to 475)
AUTHORS     Galaviz,M.A., Hernandez-Cornejo,R., Lopez,L.M. and Garcia-
            Gasca,A.
TITLE       Expression and activity of three digestive proteases during
            larval development of the Totoaba (Totoaba macdonaldi)
JOURNAL     Unpublished
REFERENCE   2(bases 1 to 475)
AUTHORS     Galaviz,M.A., Hernandez-Cornejo,R., Lopez,L.M. and Garcia-
            Gasca,A.
TITLE       Direct Submission
JOURNAL     Submitted (13-JUL-2010) Molecular Biology, CIAD, Avenida
            Sabalo Cerritos s/n, Mazatlan, Sinaloa 82010, Mexico
FEATURES             Location/Qualifiers
     source             1..475
                        /organism="Totoaba macdonaldi"
                        /mol_type="mRNA"
                        /db_xref="taxon:245095"
                        /dev_stage="larvae"
     CDS                <1..>475
                        /note="serine protease; digestive enzyme"
                        /codon_start=2
                        /product="chymotrypsin"
                        /protein_id="ADP68628.1"
                        /db_xref="GI:311102191"

/translation="WPWQVSLQQSNGFYFCGGSLINENWVVTAAHCNVRTYHRVAGE
HIKGYGSNEHVKVLKPAKVFTHPYWNPHTINNDISLIKLSTPARLGTNVSPVCLAESP
DVFSAGWTCVNSGWGLTRYNAPSTPNTLQQGALPLLSNEQCKKHWSNISGIMICA"
ORIGIN
1  ctggccatgg  caggtgtctc  tgcagcaatc  caatggcttc  tacttctgtg  gaggatctct
61  gatcaacgag  aactgggtgg  tgaccgccgc  tcaactgtaac  gtcaggacct  accaccgtgt
121  ggtcgtctga  gaacacatca  agggctacgg  ctccaacgag  cacgtcaagg  ttctgaagcc
181  cgccaaagtg  ttcaccacc  cctactggaa  cccccacaca  atcaacaacg  acatctcctt
241  catcaagttg  tccacccccg  cccgctggg  cacaaaacgtg  tcccctgtct  gcctgcgcca
301  gtcccccgat  gtcttttccg  cgggatggac  ctgcgtcaac  tccggctggg  gtctgaccgg
361  ctacaacgct  cccagtactc  ccaacacact  ccagcagggc  gccctgcccc  tgctgtccaa
421  cgagcagtcg  aagaaacact  ggggcagcaa  catctccgga  atcatgattt  gtgct
```

**Totoaba macdonaldi trypsin mRNA, partial cds**

**GenBank: HM754480.1**

LOCUS HM754480 314 bp mRNA linear VRT 02-FEB-2011  
DEFINITION Totoaba macdonaldi trypsin mRNA, partial cds.  
ACCESSION HM754480  
VERSION HM754480.1 GI:311102188  
KEYWORDS.  
SOURCE Totoaba macdonaldi  
ORGANISM [Totoaba macdonaldi](#)  
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;  
Euteleostomi; Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei;  
Euteleostei; Neoteleostei; Acanthomorpha; Acanthopterygii;  
Percomorpha; Perciformes; Percoidei; Sciaenidae; Totoaba.  
REFERENCE 1 (bases 1 to 314)  
AUTHORS Galaviz,M.A., Hernandez-Cornejo,R., Lopez,L.M. and Garcia-  
Gasca,A.  
TITLE Expression and activity of three digestive proteases during  
larval development of the Totoaba (Totoaba macdonaldi)  
JOURNAL Unpublished  
REFERENCE 2(bases 1 to 314)  
AUTHORS Galaviz,M.A., Hernandez-Cornejo,R., Lopez,L.M. and Garcia-  
Gasca,A.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (13-JUL-2010) Molecular Biology, CIAD, Avenida  
Sabalo Cerritos s/n, Mazatlan, Sinaloa 82010, Mexico  
FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..314  
/organism="Totoaba macdonaldi"  
/mol\_type="mRNA"  
/db\_xref="taxon:245095"  
/dev\_stage="larvae"  
[CDS](#) <1..>314  
/note="serine protease; digestive enzyme"  
/codon\_start=3  
/product="trypsin"  
/protein\_id="ADP68627.1"  
/db\_xref="GI: 311102189"  
  
/translation="IDIMLIKLSKPATLNSYVRTVSLASSCAAAGTRCLISGWGNTSS  
SGSNYPDLRLCLDAPILSDSSCRTAYCGQITHNMFCSGFVERGKDSWRGGAVVSGVCV  
GR"  
ORIGIN  
1 acattgacat catgctgac aagctgagca agcccgccac cctgaacagc tacgtccgca  
61 ccgtgtccct ggcctccagc tgtgacagct ctggcaccgc ctgtctgac tctggatggg  
121 gcaacaccag cagctctgga agcaactacc ctgatcgtct gaggtgcoct gatgccccca  
181 tcctgagcga cagcagctgc aggactgcct actgtggaca gatcactcac aacatgttct  
241 gttctggatt tgtcgagaga ggcaaagact cctggcgcgg tggcgcgtgt gtctccgggg  
301 tgtgcgcttg tcgg

---

**Lutjanus guttatus trypsin mRNA, partial cds**

**GenBank: HM754476.1**

LOCUS HM754476 384 bp mRNA linear VRT 02-FEB-2011  
DEFINITION Lutjanus guttatus trypsin mRNA, partial cds.  
ACCESSION HM754476  
VERSION HM754476.1 GI:311102181  
KEYWORDS.  
SOURCE Lutjanus guttatus (spotted rose snapper)  
ORGANISM [Lutjanus guttatus](#)  
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;  
Euteleostomi; Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei;  
Euteleostei; Neoteleostei; Acanthomorpha; Acanthopterygii;  
Percomorpha; Perciformes; Percoidae; Lutjanidae; Lutjanus.  
REFERENCE 1(bases 1 to 384)  
AUTHORS Galaviz,M.A., Hernandez-Cornejo,R., Lopez,L.M. and Garcia-  
Gasca,A.  
TITLE Expression and activity of three digestive proteases during  
larval development of the spotted rose snapper (Lutjanus  
guttatus)  
JOURNAL Unpublished  
REFERENCE 2(bases 1 to 384)  
AUTHORS Galaviz,M.A., Hernandez-Cornejo,R., Lopez,L.M. and Garcia-  
Gasca,A.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (13-JUL-2010) Molecular Biology, CIAD, Avenida  
Sabalo Cerritos s/n, Mazatlan, Sinaloa 82010, Mexico  
FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..384  
/organism="Lutjanus guttatus"  
/mol\_type="mRNA"  
/db\_xref="taxon:455479"  
/dev\_stage="larvae"  
[CDS](#) <1..>384  
/note="serine protease; digestive enzyme"  
/codon\_start=1  
/product="trypsin"  
/protein\_id="[ADP68624.1](#)"  
/db\_xref="GI: 311102182"  
  
/translation="NDIMLIKLTKPATLNQYVQPVALPTSCAPAGTMCTVSGWGNTMS  
STADRNQLQCLNIPILSDRDCDNSYPGMITDAMFCAGYLEGGKDCSCQGDSGGPVVCNG  
ELQGVVSWGYGCAERDHRGVYARVYI"  
  
ORIGIN  
1 aatgacatca tgctgatcaa gctgaccaag cccgccaccc tcaaccagta cgtgcagcct  
61 gtggctctgc ccaccagctg tgctcccgct ggcaccatgt gcacagtctc tggctggggc  
121 aacaccatga gctccactgc tgacagaaac cagctgcagt gcctgaacat ccccatcctg  
181 tccgacaggg actgtgacaa ctctatacct ggcatgatca ctgacgccat gttctgcgct  
241 ggatacctgg agggcggcaa ggactcttgc cagggtgact ctgggtggccc cgtcgtgtgc  
301 aacggtgagc tgcagggtgt tgtgtcctgg ggctacgat gtgctgagag ggaccaccgc  
361 ggtgtctacg ccagggtcta catc

---

**Lutjanus guttatus elastase mRNA, partial cds**

**GenBank: HM754477.1**

LOCUS HM754477 216 bp mRNA linear VRT 02-FEB-2011  
DEFINITION Lutjanus guttatus elastase mRNA, partial cds.  
ACCESSION HM754477  
VERSION HM754477.1 GI: 311102183  
KEYWORDS.  
SOURCE Lutjanus guttatus (spotted rose snapper)  
ORGANISM [Lutjanus guttatus](#)  
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;  
Euteleostomi; Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei;  
Euteleostei; Neoteleostei; Acanthomorpha; Acanthopterygii;  
Percomorpha; Perciformes; Percoidae; Lutjanidae; Lutjanus.  
REFERENCE 1 (bases 1 to 216)  
AUTHORS Galaviz, M.A., Hernandez-Cornejo, R., Lopez, L.M. and Garcia-Gasca, A.  
TITLE Expression and activity of three digestive proteases during larval development of the spotted rose snapper (Lutjanus guttatus)  
JOURNAL Unpublished  
REFERENCE 2 (bases 1 to 216)  
AUTHORS Galaviz, M.A., Hernandez-Cornejo, R., Lopez, L.M. and Garcia-Gasca, A.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (13-JUL-2010) Molecular Biology, CIAD, Avenida Sabalo Cerritos s/n, Mazatlan, Sinaloa 82010, Mexico  
FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..216  
/organism="Lutjanus guttatus"  
/mol\_type="mRNA"  
/db\_xref="taxon:[455479](#)"  
/dev\_stage="larvae"  
[CDS](#) <1..>216  
/note="serine protease; digestive enzyme"  
/codon\_start=2  
/product="elastase"  
/protein\_id="[ADP68625.1](#)"  
/db\_xref="GI:311102184"  
  
/translation="WPWQISLQYERDGVWRHTCGGSLIAANWVMTAAHCINTKLCYRV  
FVGKYNLVEEEAGSKAIVPEKIVVHEK"  
  
ORIGIN  
1 ctggcctg cagatctctc tgcagtatga gagggacggt gtgtggaggg acacttgtgg  
61 gggatctctg attgctgcca actgggcat gactgctgct cactgcatca acaccaagtt  
121 gtgtacaggt gtgtttgtgg gaaaatacaa cctggtcgag gaagaagctg gctccaaggg  
181 cattgtgctt gagaagattg tcgtccatga gaaatg

---

**Lutjanus guttatus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence**

**GenBank: HM754479.1**

LOCUS HM754479 443 bp DNA linear VRT 02-FEB-2011  
DEFINITION Lutjanus guttatus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
ACCESSION HM754479  
VERSION HM754479.1 GI:311102187  
KEYWORDS.  
SOURCE Lutjanus guttatus (spotted rose snapper)  
ORGANISM Lutjanus guttatus  
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;  
Euteleostomi; Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei;  
Euteleostei; Neoteleostei; Acanthomorpha; Acanthopterygii;  
Percomorpha; Perciformes; Percoidei; Lutjanidae; Lutjanus.  
REFERENCE 1(bases 1 to 443)  
AUTHORS **Galaviz, M.A., Hernandez-Cornejo, R., Lopez, L.M. and Garcia-Gasca, A.**  
TITLE Expression and activity of three digestive proteases during larval development of the spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*)  
JOURNAL Unpublished  
REFERENCE 2(bases 1 to 443)  
AUTHORS Galaviz, M.A., Hernandez-Cornejo, R., Lopez, L.M. and Garcia-Gasca, A.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (13-JUL-2010) Molecular Biology, CIAD, Avenida Sabalo Cerritos s/n, Mazatlan, Sinaloa 82010, Mexico  
FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..443  
/organism="Lutjanus guttatus"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/db\_xref="taxon:[455479](#)"  
/dev\_stage="larvae"  
rRNA <1..>443  
/product="18S ribosomal RNA"  
ORIGIN  
1 ggtaattcca gctccaatag cgtatcttaa agttgctgca gttaaaaagc togtagttgg  
61 acctcgggat cgagctgacg gtccgcccgc aggcgagcta ccgtctgtcc cagcccctgc  
121 ctctctccgc gccctcgatg ctcttagctg agtgctccgc gggggccgaa gcgtttactt  
181 tgaaaaaatt agagtgttca aagcaggccc ggtcgtctga ataccgcagc taggaataat  
241 ggaataggtc tccggttcta ttttgtgggt ttctctctct gaactggggc catgattaag  
301 agggacggcc gggggcattc gtattgtgcc gctagagggtg aaatacttgg accggcgcaa  
361 gacggacgaa agcgaagca ttgccaaga atgttttcat taatcaagaa cgaaagtcgg  
421 aggttcgacg acgatcagat acc

---

**Lutjanus guttatus pepsinogen mRNA, partial cds**

**GenBank: HM754478.1**

LOCUS HM754478 470 bp mRNA linear VRT 02-FEB-2011  
DEFINITION Lutjanus guttatus pepsinogen mRNA, partial cds.  
ACCESSION HM754478  
VERSION HM754478.1 GI:311102185  
KEYWORDS.  
SOURCE Lutjanus guttatus (spotted rose snapper)  
ORGANISM [Lutjanus guttatus](#)  
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;  
Euteleostomi; Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei;  
Euteleostei; Neoteleostei; Acanthomorpha; Acanthopterygii;  
Percomorpha; Perciformes; Percoidei; Lutjanidae; Lutjanus.  
REFERENCE 1 (bases 1 to 470)  
AUTHORS Galaviz, M.A., Hernandez-Cornejo, R., Lopez, L.M. and Garcia-Gasca, A.  
TITLE Expression and activity of three digestive proteases during larval development of the spotted rose snapper (Lutjanus guttatus)  
JOURNAL Unpublished  
REFERENCE 2 (bases 1 to 470)  
AUTHORS Galaviz, M.A., Hernandez-Cornejo, R., Lopez, L.M. and Garcia-Gasca, A.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (13-JUL-2010) Molecular Biology, CIAD, Avenida Sabalo Cerritos s/n, Mazatlan, Sinaloa 82010, Mexico  
FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..470  
/organism="Lutjanus guttatus"  
/mol\_type="mRNA"  
/db\_xref="taxon:455479"  
/dev\_stage="larvae"  
[CDS](#) <1..>470  
/note="pepsin; protease; digestive enzyme"  
/codon\_start=2  
/product="pepsinogen"  
/protein\_id="[ADP68626.1](#)"  
/db\_xref="GI:311102186"  
  
/translation="HQSCSLKWGNQQLSIQYGTGSMTGYLASDTVEVGGITVVNQVFG  
ISQCKAAAFMAHMTADGILGLAFQSIASDNVVPVFDNMIKQNLVSPMFSVYLSGNSQQ  
GSEVVSRSIDSSHYTGVQVTWIPLTSATYWQIKMDSVTINGQTVACSGGCPAIIID"  
  
ORIGIN  
1 tcaccagtca tgctcactca agtggggcaa ccagcaactg tccatccaat acggcactgg  
61 cagcatgacc ggatatctgg ccagcgacac tgttgagggtg ggcggcatca ctgtggtcaa  
121 ccagggtgtt ggaatcagcc aatgcaaggc tgccttcctg gctcacatga ctgctgacgg  
181 catcctggga ttggccttcc agtccatgoc ctctgacaac gtcgtgctctg tottogacaa  
241 catgatcaag cagaacctgg tgtcccagcc aatggttctct gtctacctga gcggtaacag  
301 ccagcagggc agtgagggtgg tctcgcgcag tatcgacagc agccactaca ctggacaagt  
361 cacctggatc cctctgacct ctgccacctc ctggcagatc aagatggaca gcggttaccat  
421 caacggacag accgttgctt gctccgggtgg ctgcccagcc atcatcgaca

**Atractoscion nobilis elastase mRNA, partial cds**

**GenBank: HM754484.1**

LOCUS HM754484 501 bp mRNA linear VRT 02-FEB-2011  
DEFINITION Atractoscion nobilis elastase mRNA, partial cds.  
ACCESSION HM754484  
VERSION HM754484.1 GI:311102195  
KEYWORDS.  
SOURCE Atractoscion nobilis (white weakfish)  
ORGANISM [Atractoscion nobilis](#)  
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;  
Euteleostomi; Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei;  
Euteleostei; Neoteleostei; Acanthomorpha; Acanthopterygii;  
Percomorpha; Perciformes; Percoidei; Sciaenidae;  
Atractoscion.  
REFERENCE 1 (bases 1 to 501)  
AUTHORS **Galaviz, M.A., Hernandez-Cornejo, R., Lopez, L.M. and Garcia-Gasca, A.**  
TITLE Expression and activity of a serine protease in the white seabass (*Atractoscion nobilis*)  
JOURNAL Unpublished  
REFERENCE 2 (bases 1 to 501)  
AUTHORS Galaviz, M.A., Hernandez-Cornejo, R., Lopez, L.M. and Garcia-Gasca, A.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (13-JUL-2010) Molecular Biology, CIAD, Avenida Sabalo Cerritos s/n, Mazatlan, Sinaloa 82010, Mexico  
FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..501  
/organism="Atractoscion nobilis"  
/mol\_type="mRNA"  
/db\_xref="taxon:259703"  
/dev\_stage="larvae"  
[CDS](#) <1..>501  
/note="serine protease; digestive enzyme"  
/codon\_start=2  
/product="elastase"  
/protein\_id="[ADP68630.1](#)"  
/db\_xref="GI:311102196"  
  
/translation="WPWQISLQSERDGVWRHTCGGSLIAANVWMTAAHCINTKLVHRV  
LVGNDNLVEEEAGSKAILPEKIVVHEKWNPIFVAFGNDIALIKLSESVPLSDQVQLGC  
IPPAGSVLSNLYPCYITGWGRLYTGGPIADKLQALMPVADHATCSQPDWWGIAVRM  
MICAGG"  
  
ORIGIN  
1 ctggcctg cagatctct tgcagtctga gagggatggc gtgtggaggc acacttggtg  
61 gggatctctg attgctgcca actgggcat gactgctgct cactgcatca acaccaagct  
121 cgtccacagg gtgcttggtg gcaatgacaa cctggctgag gaggaggctg gctccaaggc  
181 catcctgcct gagaagattg ttgtccatga gaaatggaac cccatctttg tggccttcgg  
241 taacgatatt gccctgatca agctgtcaga gtctgtgct ctgagtgacc aggtacagct  
301 gggatgtatc cctcctgctg gctctgtgct gtccaacctc taccctgct acatcacggg  
361 atggggcagg ctgtacactg gaggcccat agctgataag ctgcagcagg ctttgatgcc  
421 tgtggctgac catgccacct gctcccagcc tgactgggtg ggtatcgctg tcagaacct  
481 gatgatttgt gctggtggg a

---

## **EXTRACCION DE RNA TOTAL CON TRIZOL**

El protocolo para la extracción del RNA total de larvas completas y sistema digestivo de especies en estudio se describe a continuación.

1. Se retiró el RNA later de las muestras.
2. Se homogenizó el tejido en 500 µl de trizol.
3. Se pasó el tejido a través de una jeringa.
4. Se incubó 5 min a temperatura ambiente (T.A).
5. Se añadió 100 µl de cloroformo y se agitó vigorosamente.
6. Se incubó a T.A por 3 min.
7. Se centrifugó a 12000 g por 15 min a 4 °C.
8. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio.
9. Se agregó 250 µl de isopropanol y se agitó un poco.
10. Se incubó a T.A por 15 min.
11. Se centrifugó a 12000 g por 10 min a 4 °C.
12. Se retiró el sobrenadante.
13. Se agregó 500 µl de etanol al 70 % al pellet.
14. Se centrifugó a 12000 g por 5 min 4 °C.
15. Se retiró el sobrenadante.
16. Se añadió 45 µl de H<sub>2</sub>O DEPC y se re-suspendió el pellet.
17. Se procedió a realizar el tratamiento con DNAsa I:

<b>Reactivos</b>	<b>1X</b>
Agua DEPC	8
Buffer 10X DNAsa	3.5
RNA sin	0.5
DNAsa I	3
<b>Total</b>	<b>15 µl</b>

18. Se agregó 15 µl de la mezcla a cada tubo.
19. Se incubó 30 min a 37 °C.
20. Se añadió 6.5 µl de LiCl 4M.
21. Se añadió 65 µl de fenol-cloroformo y vortex.
22. Se centrifugó 10 min a T.A.
23. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio.
24. Se agregó 2.5 volúmenes de etanol absoluto.
25. Se precipitó por 2 horas a -80 °C o toda la noche a 4 °C.
26. Se centrifugó 15 min a 12000 g a 4 °C.
27. Se retiró el sobrenadante.
28. Se añadió 500 µl de etanol al 70%.
29. Se retiró el sobrenadante.
30. Finalmente se agregó 40 µl de agua DEPC para re-suspender el pellet.

### **SINTESIS DE DNA COMPLEMENTARIO (cDNA)**

Para sintetizar cDNA, se llevó a cabo el siguiente protocolo:

1. Se mezclaron 5 µl de RNA + 1 µl de random.
2. Se Incubaron a 70 °C por 10 min. hielo---centrifugar---hielo.
3. Preparar mezcla: se vertieron las siguientes cantidades a cada tubo.

<b>Reactivos</b>	<b>Con enzima</b>	<b>Sin enzimas</b>
	1X	1X
H <sub>2</sub> O DEPC	7.7	8.5
Buffer 5x M-MLV	4	4
dNTP´s 10mM	1	1
RNA sin	0.5	0.5
M-MLV	0.8	X
<b>Total</b>	<b>14 µl</b>	<b>14 µl</b>

4. Se añadió 14 µl de la mezcla a cada tubo.
5. Se Incubó a T.A por 10 min.
6. Se incubó a 45 °C por 1 hora.
7. Se incubaron a 90-95 °C por 5 min, inmediatamente en hielo.....centrifugar.
8. Se almacenó a -20 °C.

**Amplificación de los genes de tripsina, quimotripsina y pepsina por PCR  
(Reacción en Cadena de la Polimerasa)**

a. Se preparó la mezcla maestra:

<b>Reactivos</b>	<b>1X</b>
Agua-----	9.23 $\mu$ l
2.5mM dNTPs-----	0.66 $\mu$ l
10X buffer-----	1.25 $\mu$ l
Primer Tryp 296 (250 $\mu$ g/ml)-	0.13 $\mu$ l
Primer Tryp 670 (250 $\mu$ g/ml)-	0.13 $\mu$ l
Advantage 2 polymerase mix (Clontech)-----	0.1 $\mu$ l
<b>Volumen final de la mezcla-</b>	<b>11.5 <math>\mu</math>l</b>

b. Se añadió 1 ml de DNA a mezcla maestra para obtener un volumen final de 12.5  $\mu$ l.

c. La amplificación de los fragmentos de DNA se llevó a cabo usando un termociclador Hybaid Sprint. Las condiciones iniciales de PCR fueron: 94 °C 2 min un ciclo, seguido por 35 ciclos a 94 °C 1 min, 62 °C 1 min y 72 °C 1 min. Como control interno de la integridad del RNA y cDNA se utilizaron oligos diseñados para amplificar el gen 18S rRNA, utilizando los siguientes oligos:

18srRNA-F 5'-GTT AAT TCC AGC TCC AAT AGC GTA-3'

18srRNA-R 5'-GAA CTA CGA CGG TAT CTG ATC GTC-3'

## **Electroforesis**

Los productos de PCR se reconocieron corriendo un gel de agarosa al 2% en una cámara de electroforesis (E-C minicell, USA) con un voltaje constante de 80 V entre 30 y 45 min. La electroforesis se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Se preparó un gel de agarosa 2% en buffer Tris-acetato (TAE) con 0.5 mg/ml de bromuro de etidio.
2. Se mezcló el producto de PCR con 2 ml de buffer de carga (6x sucrosa).
3. El DNA se colocó en las pozas del gel.
4. Se aplicó carga de 80 volts por ~30 minutos.
5. El gel se observó en un transiluminador de UV de onda corta.
6. Se documentó el resultado usando un fotodocumentador de geles UVP  
BioImaging Systems.

## **PURIFICACION DEL PRODUCTO DE PCR**

Con wizard SV gel y PCR clean-up system (promega):

El fragmento amplificado se purificó de la siguiente manera.

1. Se corrió un gel de agarosa 2 % limpio con 0.5 mg/ml de bromuro de etidio.
2. Se pesó un tubo ependorf esteril y se corto la banda y se coloco en el tubo pesado.
3. Se juntó el producto de PCR en un solo tubo.
4. Se añadió un volumen de membrane binding solution.
5. Se colocó una columna en un tubo colector por cada muestra.
6. Se transfirió el DNA a la columna y se incubó por 1 min.
7. Se centrifugó a 12000 rpm por 1 min.
8. Se descartó el lavado.
9. Se lavó con 700 µl de membrane wash solution.
10. Se centrifugó a 12000 rpm por 1 min y se descartó el lavado.
11. Se lavó con 500 µl de membrane wash solution.
12. Se centrifugó a 12000 rpm por 5 min y se descartó el lavado.
13. Se volvió a poner la columna en el tubo y se centrifugó 1 min (en seco).
14. Se transfirió la columna a un tubo eppendorf limpio.
15. Se añadió 25-50 µl de agua libre de nucleasas.
16. Se incubó 1 min a T.A.
17. Se centrifugó a 12000 g por 1 min.
18. Se retiró la columna y se almacenó a -20 °C.

**Clonación del fragmento purificado**

**LIGACION**

Con pGEMT Easy Vector:

<b>Reactivos</b>	<b>1X</b>
Buffer 2X ligation	10 µl
pGEMT Easy Vector	1 µl
DNA (purificado)	8 µl
DNA ligasa (T4)	1 µl
<b>Total</b>	<b>20 µl</b>

1. Se incubó por 2 horas a T.A.
2. Se almacenó a -20 °C.

## **TRANSFORMACION**

1. Se prepararon cajas de petri con LB-AMP. (dejar secar a T.A en lugar estéril).
2. Se sacaron bacterias (*E. coli*) de -80 °C, se colocaron directo en hielo y se dejaron descongelar.
3. Mezclar: Vector + inserto = ligación 5 µl + 50 µl de bacterias.
4. Se Incubaron en hielo por 30 min.
5. Choque térmico a 37 °C por 20 segundos.
6. Regresar al hielo por 2 min.
7. Se inocularon en 1.5 ml de medio SOC (en la campana).
8. Se transfirió a un tubo para centrifuga.
9. Se Incubaron a 37 °C con agitación por 1 hora.
10. Se centrifugaron a máxima velocidad (12000 rpm) por 5 min a T.A.
11. Se descartó el sobrenadante y se re suspendió el pellet en el residuo del mismo medio.
12. Se inocularon cajas de LB-Amp: 40 µl de X-GAL + 7 µl de IPTG.
13. Se incubaron toda la noche a 37 °C.

### **LEVANTAMIENTO DE COLONIAS**

1. Se preparó LB-Amp en la campana.
2. Dependiendo del número de muestras se preparó:  

1 ml LB -----> 2.4 µl

10 ml LB-----> 24 µl
3. Se distribuyó en 13 tubos falcon, 2 ml de LB-Ampicilina por tubo previamente preparado.
4. Se levantaron las colonias más aisladas con un palillo de madera estéril y se colocaron una colonia por tubo.
5. Se Incubó a 37 °C con agitación a 240 rpm toda la noche.

## **MINIPREPS**

Protocolo detallado de minipreps en laboratorio de biología molecular (Ciudad de Mazatlán).

1. Se transfirió 1.5 ml de cultivo bacteriano a un tubo eppendorf limpio y estéril.
2. Se centrifugó 1 minuto (min) a 12 000 g y se eliminó el sobrenadante totalmente.
3. Se agregó 100 µl de cell-resuspension solution y se re-suspendió el pellet.

Preparación: (50mM Tris-Hcl pH 8.0)

(10mM EDTA pH 8.0 -----20 µl RNasa)

4. Se agregó 100 µl de buffer de lisis (200 mM NaOH, y 1% SDS) y se mezcló. Tomar ½ del volumen total a preparar.
5. Se agregó 120 µl de buffer de neutralización (3 mM acetato de potasio pH 5.5.) y se mezcló por 3 minutos.
6. Se centrifugó 1 min a máxima (14000 g) y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio.
7. Se agregó 200 µl de isopropanol y se mezcló.
8. Se centrifugó 1 min a máxima y se descartó el sobrenadante.
9. Se agregar 500 µl de etanol al 70% y se mezcló.
10. Se centrifugó 1 min a máxima y se descartó el sobrenadante, se volvió a centrifugar y se eliminó con cuidado el sobrenadante.
11. Se agregó 25 µl de agua estéril y se resuspendió el pellet.

12. Se procedió a realizar la digestión enzimática.

### **DIGESTION ENZIMATICA**

Preparar:

Reactivos	1X
Agua 18Ω esteril	7.1
Buffer 10X	1
BSA 100X	0.1
ECOR I	0.8

1. Se distribuyó 9 µl de la mezcla en cada tubo.
2. Se agregó 1 µl de DNA (minipreps).
3. Se incubó a 37 °C por 2 horas.
4. Después de la incubación se corrió un de gel de agarosa al 1% limpio para identificar los clones con inserto.

### **Secuenciación (Licor IR<sub>2</sub>)**

La secuenciación bidireccional se llevó a cabo con los clones obtenidos de tripsina, quimotripsina y pepsina anteriormente identificados por la digestión. La mezcla para la secuenciación fue la siguiente.

<b>Reactivos</b>	<b>1X</b>
Agua	3.4 µl
T7 (IRD 700)	0.75 µl
SP6 (IRD 800)	0.75 µl
Buffer seq	3.6 µl
Excel II DNA pol	0.5 µl
<b>Total</b>	<b>9 µl</b>

Del tubo numero 1 se le agregó 2 ml a 4 tubos nuevos marcados A,C,G,T, después se les agregó 1 ml de A,C,G ó T “terminator mix”.

Luego se pusieron en el termociclador con las siguientes condiciones.

92 °C -----2 min a 1 ciclo  
92 °C -----30 seg  
45 °C -----30 seg 30 ciclos  
70 °C -----1 min

Una vez concluida la reacción se añadió 1.5 µl de “stop sol” a cada tubo y se volvieron a colocar en el termociclador por 3 minutos a 92 °C.

Por último se pusieron en hielo y se almacenaron en refrigeración, en oscuridad, hasta que se cargaron en el gel de poliacrilamida para la secuenciación utilizando un secuenciador Licor IR<sub>2</sub>.

### **Análisis de secuencia**

Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el programa BLAST (National Center of Biotechnology Information, USA) para observar el grado de similitud con secuencias de otras especies. Posteriormente se hizo una alineación de clones para conocer el consenso de la secuencia obtenida usando el programa Multalin (Institut National de la Recherche Agronomique, Toulouse, Franc. A partir de estos resultados se diseñaron oligos específicos para los genes de tripsina, quimotripsina y pepsina de *T. macdonaldi* y *Lutjanus guttatus*, utilizando el programa PRIMER 3.

Por último se realizó un análisis de qPCR (PCR cuantitativo) de todas las muestras con la siguiente reacción.

**qPCR**

**Green Real Time PCR- Premix-Choice Kit**

<b>Reactivos</b>	<b>1X</b>
H <sub>2</sub> O 18Ω	9.5
2X Green Mix	12.5
Primer F	0.5
Primer R	0.5
Enzima blend	1 μl
<b>Total</b>	<b>24 μl</b>

1. Se repartió 24 μl de la mezcla en cada tubo para PCR.
2. Se agregó 1 μl de cDNA y se mezcló.
3. Se pasó la reacción de PCR a tubos de qPCR.
4. Se corrió qPCR.

Tabla VII. Oligos degenerados utilizados en la búsqueda de oligos específicos para las especies en estudio.

<b>Nombre del oligo</b>	<b>Secuencia</b>
Tripsina-F	5´- GAC ATC ATG CTG ATC AAG CTG AC -3´
Tripsina-R	5´- GAC CYT GGC RTA GAC ACC RGG -3´
Quimotripsina-F	5´- CTG GCC HTG GCA RRT STC -3´
Quimotripsina-R	5´- HCC AGC RCA VAY CAT SRT -3´
Pepsina-F	5´- GGM TCC TCM AAC CTG TGG RT -3´
Pepsina-R	5´- GTC RAY GAT RGC CTG GCA -3´

**Tabla VIII. Secuencias nucleotídicas parciales de enzimas digestivas obtenidas de larvas de totoaba y corvina no registradas en GenBank.**

---

**>TOTOABA FOSFATASA ALCALINA (428 BASES)**

---

CTGCGACGCCTGCTCGTATACTGAAGGGTCAGCTAAACGTGCAGAGTGGAGAGGAGACCC  
AGCTGGAGATGGACAAGTTCCCCTTTGTGTCTTTGGCCAAGACATACAACACTAACGCGC  
AGGTGCCAGACAGCGCCGGCACCGCCACAGCTTATCTCTGCGGGGTCAAGGCCAATGAGG  
GCACGGTGGGAGTGAGTGCAGCTGCTGTCCGATCCCAGTGTAACACCACACAGGGCAATG  
TAGTCACCTCCATACTCAGATGGGCTAAGGACGCAGGCAAGTCAGTGGGAATAGTGACAA  
CAACCCGTGTCAACCATGCGACTCCCAGTGCTGCCTACGCCACAGCGTGGACAGAGACT  
GGTACTCCGACAATGAGATGCCACGTGAAGCTCTGCAGTCCGGCTGCAAAGACATCGCCA  
GACAACTC

---

**>AMILASA CORVINA (380 BASES)**

---

GCTACAACCTGTGCTCGAATTCTGGCAGCGAGAACGATCTGAGAGACATGATCACCAGAT  
GCAACAACGTTGGGGTCAACATCTACGTGGACGCTGTCATCAACCGTATGTGCGGCGCCG  
GTGGTGGAGAGGGGACACACAATCTCTGTGGAAGCTGGTTCAATGCTAGCAAGAAGGACT  
CCCCTACCTGTCCCTATACCCACTGGGACTTCAATGACAACAAATGCAGGACTGGCAGTG  
GTAACATTGAGAACTATGGTGATGCCAATCAGGTACGTGACTGTCGTCTGGTTCGTCTGT  
TGGACCTCGCCCTGGAGAAAGAGTATGTCAGGGGTAAGGTGGTCGACTTCATGAACAAGC  
TGATCGACATGGGTGTTGCT

---

**>CATHEPSIN-D corvina final (508 bases)**

---

ACTGGATCCTCCAACCTGTGGGTGCCCTCCATTCACTGCTCCATCTTGGACATTGCTTGC  
TTGCTTCACCACAAATATAACTCTGCCAAGTCCAGCACATACGCGAAGAACGGCACGGCC  
TTCGCCATCCAGTATGGATCTGGCAGCTTGTCGGGCTTCCTCAGTCAGGACACATGGACA  
ATCGGAGACGTTACAGTGGCAAATCAGCTTTTCGGAGAGGCCACCAAGCAGCCCGGGATG  
GCTTTCATCGCGGCCAAGTTCGACGGGATCCTCGGCATGGCGTTCCCACGAGTCTCTGTG  
GACGGGGTGGCTTCGGTCTTTGACAACATCATGAGCCAGAAGAAGGTGGAGAAGAACGTC  
TTCTACTTCTATCTGAACAGAAACCCCGACACCGAGCCCGGCGGCGAGCTGATGCTGGGA  
GGAACCGACCCAAAATACTACACTGGTGACTTCAACTACATCAACATCACCCGGCAGGCG  
TACTGGAAGATCAACATGGACGGGATAG

---

**>Rib-corvina (358 bases)**

---

TCGGCACTGTAGTGCCCGGGCCGCGTCTGCTGTACGACCTGTCATGCCCTCGATGCCTAC  
TAGTGGCTGCCAGAAAGTTTACTCTGACAAAAGTAAAGTGGTTAAAGCGAGCAGCCTGTG  
CTTGTACAAAGAGCTATGGAATAATATGATAGCACCTCGATCCGATTTTGTGGTTTCGT  
TTCTGAGAGTGGGCAGTGAGTCTGAAGGACGGCCGGGGGCATTCGTATTGTGCCGCATAG  
AGTGAAATTCTTGACTIONGGCGGAAGACGGACGAAAGCGAAAGCATTGCCAAGAATGTT  
TTCATTAATCAAGAACGAAAGTCGGAGGGTCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCA

---